

DEPARTAMENTO DE FARMACIA Y TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

ESTUDIO DEL MECANISMO DE ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO EN LA RATA

PATRICIO MÁS SERRANO

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 10 de Juny de 2005 davant un tribunal format per:

- D^a. Marina Herráez Domínguez
- D. Luis Granero Macia
- D. Juan Pablo Ordovas Baines
- D. Teodoro Zorzona Sabina
- D. Gerardo Manuel Antón Fos

Va ser dirigida per:

D^a. Ana Polache Vengut

D. Rafael Martín Algarra

©Copyright: Servei de Publicacions
Patricio Más Serrano

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6358-2

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Artes Gráficas, 13 bajo

46010 València

Spain

Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

**“Estudio del mecanismo de absorción intestinal
del acamprosato en la rata”**

Tesis Doctoral

Patricio Más Serrano
Valencia, 2005

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
FACULTAD DE FARMACIA
VNIVERSITAT D VALÈNCIA

**“Estudio del mecanismo de absorción intestinal
del acamprosato en la rata”**

Memoria que, para optar al grado
de Doctor en Farmacia, presenta:

Patricio Más Serrano

Valencia, a 10 de Febrero 2005

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica
FACULTAD DE FARMACIA
VNIVERSITAT Đ VALÈNCIA

Los que suscriben, **Dña. Ana Polache Vengut**, Doctora en Farmacia y Profesora Titular del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia, y **D. Rafael Martín Algarra**, Doctor en Farmacia y Profesor Titular del Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Universidad Cardenal Herrera CEU:

CERTIFICAN:

Que la memoria para optar al grado de Doctor en Farmacia realizada por **D. Patricio Más Serrano**, cuyo título es:

“Estudio del mecanismo de absorción intestinal del acamprosato en la rata”

ha sido realizada bajo su dirección y reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

Lo que suscriben en Valencia, a 10 de Febrero de 2005

Fdo. Dra. Ana Polache Vengut

Fdo. Dr. Rafael Martín-Algarra

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada gracias a los siguientes proyectos de investigación financiados por la Consellería de Educación y Ciencia de la Generalitat Valenciana:

"Estudio del mecanismo de absorción intestinal de un nuevo fármaco utilizado en el tratamiento de la dependencia alcohólica: acamprosato" (AE98-12).

"Optimización de la farmacoterapia de la dependencia alcohólica con acamprosato: estudios de los mecanismos de absorción y eliminación del fármaco: estrategias para la mejora de las pautas posológicas" (GV99-199-1-4).

A Isabel

A mis padres,
mis hermanos y,
mi familia.

FE DE ERRATAS

Página 31, cuarto párrafo, Ecuación 1.7, donde dice:

$$“v = \frac{dA}{dt} = -\frac{V_m \cdot A}{K_m + A}”,$$

debe decir: $“v = -\frac{dA}{dt} = \frac{V_m \cdot A}{K_m + A}”$.

Página 33, segundo párrafo, Ecuación 1.10, donde dice

$$-\frac{dA}{dt} = -\frac{V_m \cdot A}{K_m + A} + k_a \cdot A”, \text{ debe decir } “-\frac{dA}{dt} = \frac{V_m \cdot A}{K_m + A} + k_a \cdot A”$$

Página 56

**TABLA CONCENTRACIONES DE LAS DISOLUCIONES DE
ACAMPROSATO (μM)**

Grupo Sólido	
Donde dice	Debe decir
1000	--
--	600

Página 87
Cuadro 3.1

Concentración de Acamprosato (μM)						Concentración de Acamprosato (μM)	
Donde dice			Debe decir			5000	
25	100	600	100	600	1000	Donde dice	Debe decir
						2232.59	1004.24

Página 90
Cuadro 3.4

Concentración Acamprosato (μM)	CONTROL			
	Donde dice		Debe decir	
	$\phi \pm S$	CV%	$\phi \pm S$	CV%
1000	-	-	192.80 \pm 36.73	19.05
600	192.80 \pm 36.73	19.05	118.23 \pm 16.87	14.27
100	118.23 \pm 16.87	14.27	20.76 \pm 3.03	14.60
25	20.76 \pm 3.03	14.60	-	-

Página 108, último párrafo, donde dice: “**Cuadro 3.14:**...”, debe decir: “**Cuadro 3.13:**...”.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 1: Antecedentes	5
1.1 ACAMPROSATO.....	5
1.1.1 Estructura y propiedades fisicoquímicas del acamprosato	5
1.1.2 Indicaciones	8
1.1.3 Propiedades farmacológicas.....	8
1.1.4 Mecanismo de acción	9
1.1.5 Farmacocinética	11
1.1.5.1 Absorción	11
1.1.5.2 Distribución	14
1.1.5.3 Metabolismo y eliminación	14
1.1.5.4 Edad y sexo	16
1.1.5.5 Insuficiencia hepática	17
1.1.5.6 Insuficiencia renal.....	18
1.1.6 Eficacia	18

1.1.7 Interacciones farmacológicas	20
1.1.8 Toxicidad y reacciones adversas	22
1.1.9 Posología y forma de administración	25
1.2 MECANISMOS DE ABSORCIÓN INTESTINAL	26
1.2.1 Mecanismos de absorción pasiva	27
1.2.2 Mecanismos de transporte especializado	30
1.3 ETANOL Y SU INFLUENCIA EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL	34
1.3.1 Introducción	34
1.3.2 Características farmacocinéticas del etanol	35
1.3.3 El alcoholismo y el estado nutricional	37
1.3.4 Alteraciones anatomofisiológicas del tracto gastrointestinal causadas por el etanol	39
1.3.5 Efectos del etanol sobre la funcionalidad de la membrana intestinal	41
1.3.5.1 Efectos del etanol sobre la permeabilidad de la membrana	43
1.3.6 Influencia del etanol sobre la absorción intestinal de fármacos	45
1.4 OBJETIVOS	48
Capítulo 2: Materiales y Métodos	49
2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN	49
2.1.1 Dieta líquida	50
2.1.1.1 Grupo Control	53
2.1.1.2 Grupo Crónico	54
2.1.2 Dieta Sólida	54
2.2 DISOLUCIONES DE ENSAYO	55
2.2.1 Disolución base	55
2.2.2 Disolución nutritiva	55

2.2.3 Disoluciones de acamprosato	56
2.2.4 Disoluciones de acamprosato en los estudios de inhibición.....	58
2.2.5 Disolución de manitol.....	59
2.2.6 Disolución de ácido nítrico	59
2.2.7 Líquido de centelleo.....	59
2.3 ENSAYO DE ABSORCIÓN <i>IN VITRO</i>	60
2.3.1 Cámara de incubación	60
2.3.2 Placas	62
2.3.3 Descripción del proceso completo	64
2.4 TÉCNICA ANALÍTICA	66
2.4.1 Fundamento de la técnica: conteo de centelleo en fase líquida	66
2.4.2 Actividad radiactiva. Unidades de medida	67
2.4.3 Eficiencia e interferencias en el conteo.....	68
2.4.3.1 Eficiencia.....	68
2.4.3.2 Interferencias en el conteo	69
2.4.4 Equipo de valoración utilizado	70
2.4.5 Conteo simultáneo de ^3H y ^{14}C	70
2.4.6 Puesta a punto del método de valoración.....	72
2.4.7 Preparación de las muestras a valorar	73
2.5 MÉTODOS MATEMÁTICOS	75
2.5.1 Consideraciones previas.....	75
2.5.2 Fármaco adherido a la membrana del enterocito y no transportado.....	76
2.5.3 Fármaco transportado o absorbido.....	78
2.5.4 Conversión de la actividad en cantidad de acamprosato absorbida	78
2.5.5 Flujo de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos	80

2.5.6 Determinación de la constante de absorción k_a	81
2.6 MÉTODOS ESTADÍSTICOS	81
2.6.1 Cálculo y análisis estadístico de la k_a del acamprosato...	81
2.6.2 Influencia de distintos aminoácidos en la velocidad de absorción del acamprosato.....	82
2.6.3 Influencia del sodio en la velocidad de absorción del acamprosato	83
Capítulo 3: RESULTADOS.....	85
3.1 FLUJO DE ACAMPROSATO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA DE LOS MICROVILLI	85
3.2. CINÉTICA DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO	92
3.2.1. Regresión lineal.	92
3.2.2 Comparación estadística de las pendientes. Análisis de varianza	99
3.3 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE INTESTINAL DEL ACAMPROSATO.....	99
3.3.1 Comparación de los flujos de acamprosato en ausencia y en presencia de inhibidor.....	106
3.4 INFLUENCIA DEL Na^+ EN EL TRANSPORTE INTESTINAL DEL ACAMPROSATO.....	115
Capítulo 4: DISCUSIÓN	119
4.1 CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO	120
4.2 INFLUENCIA DE LA DIETA Y DEL ALCOHOL EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO.....	123
4.3 INFLUENCIA DE DISTINTOS AMINOÁCIDOS EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO.....	127
Capítulo 5: RESUMEN y CONCLUSIONES.....	133

Capítulo 6: BIBLIOGRAFÍA.....	137
--------------------------------------	------------

INTRODUCCIÓN

La recaída en el consumo de alcohol es uno de los problemas más importantes con los que se enfrenta tanto el paciente alcohólico, como el equipo clínico que lo trata. Alrededor del 50% de los pacientes alcohólicos recaen durante los tres meses siguientes a la finalización del tratamiento deshabitador (Whitworth y *col.*, 1996). Por lo tanto, desde el punto de vista clínico, uno de los principales objetivos en el tratamiento de la dependencia alcohólica, es aumentar la tasa de abstinencia tras la interrupción brusca del consumo de alcohol (Litten y Allen, 1998).

Hasta hace relativamente poco tiempo, el arsenal terapéutico disponible en el tratamiento del alcoholismo estaba restringido prácticamente a los clásicos fármacos aversivos (disulfiram y cianamida) que, junto con el tratamiento psicoterapéutico, constituían los pilares básicos de las actuaciones clínicas. Sin embargo, los importantes avances que se han realizado en la comprensión de los mecanismos

neurofisiológicos implicados en la adicción al alcohol, han supuesto un impulso decisivo en la búsqueda de nuevos fármacos que permitan la prevención de recaídas. Dentro de esta línea de investigación se autorizó, inicialmente en países de la Unión Europea (1995) y posteriormente en España (1997), la comercialización de acamprosato en la terapia de mantenimiento de la abstinencia en pacientes dependientes del alcohol. En el 2004 la agencia estadounidense *Food and Drug Administration* (FDA) autorizó su comercialización en los Estados Unidos.

El acamprosato (bisacetilhomoturinato cálcico) ha demostrado ser un fármaco eficaz en el mantenimiento de la abstinencia en pacientes dependientes del alcohol. La eficacia de este fármaco se ha atribuido a su efecto “anticraving”, es decir, a su capacidad para disminuir el deseo compulsivo de consumir alcohol (Littleton, 1995; Spanagel y Zieglgansberger, 1997). El tratamiento con acamprosato debe iniciarse inmediatamente tras el periodo agudo de desintoxicación y mantenerse de 6 a 12 meses, y siempre combinado con psicoterapia. El acamprosato se administra en forma de comprimidos con recubrimiento gastrorresistente y su pauta terapéutica usual es de 2 gramos al día repartido en tres dosis.

A pesar de los numerosos ensayos clínicos para evaluar su eficacia, se conocen, en general, pocos datos sobre la farmacocinética del acamprosato y, todavía menos, sobre su absorción a nivel intestinal. De hecho, los pocos estudios existentes, por no decir la totalidad de los mismos, son documentos internos del laboratorio farmacéutico que ha desarrollado el medicamento, a los cuales ha tenido acceso Saivin y col. (1998), y que se resumen en el trabajo de revisión publicado por este grupo. Por tanto, aunque muchos datos recopilados en la presente memoria se han obtenido a partir de este trabajo, se ha considerado oportuno, citar también en primer lugar la fuente referencial original.

El acamprosato posee una baja biodisponibilidad oral. Varios autores (Saivin y *col.*, 1998; Chabenat y *col.*, 1988) han postulado que la absorción del acamprosato es errática y muy escasa. En humanos los datos de biodisponibilidad en magnitud obtenidos se sitúan en torno al 10%. Este hecho obliga a la administración de dosis diarias altas, lo que encarece y resulta más incómodo para el paciente el tratamiento con este fármaco y, lo que es más grave, puede ser el responsable del fracaso terapéutico detectado en una cierta proporción de pacientes tratados.

En el presente trabajo, y con el objetivo de identificar alguna de las causas de la escasa biodisponibilidad oral de acamprosato, se ha estudiado el mecanismo de absorción del fármaco en el tramo medio del intestino delgado de rata, utilizando para ello una técnica *in vitro*. Así mismo, se ha estudiado la influencia que ciertos factores puedan tener sobre la absorción, como son el alcoholismo crónico (utilizando un modelo de alcoholización en ratas) o el tipo de dieta administrada a la rata (dieta sólida vs. dieta líquida). Por último, también se ha evaluado la influencia de distintos aminoácidos estructuralmente relacionados con el acamprosato (taurina, glicina, prolina y GABA) en la absorción del mismo con el objetivo de caracterizar la posible existencia de mecanismos de absorción facilitada.

Capítulo 1: Antecedentes

1.1 ACAMPROSATO

1.1.1 Estructura y propiedades fisicoquímicas del acamprosato

El acamprosato es un derivado sintético de la homotaurina, cuya denominación química es bis-acetilhomotaurinato cálcico o acetilaminopropano sulfonato cálcico (*Figura 1.1*). Su peso molecular es de 403,39 g/mol y presenta una estructura análoga a ciertos aminoácidos farmacológicamente activos como taurina, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y glutamato (*Figura 1.2*) (Littleton, 1995).

El acamprosato es un polvo blanco, inodoro o prácticamente inodoro y de sabor amargo. Es soluble en agua, en un medio gástrico artificial y en la mayoría de fluidos fisiológicos (Faus Soler y *col.*, 1997).

Chabenat y col. estudiaron las propiedades fisicoquímicas del acamprosato y observaron que en disolución acuosa se encuentra prácticamente disociado (98%) originando dos moléculas de acetilhomotaurinato y un ión Ca^{2+} . Sus disoluciones acuosas presentan un pH que varía entre 5.5 y 7. Los ensayos potenciométricos realizados confirmaron que el acetilhomotaurinato calcio es una base débil, de lo que se deduce que su ácido conjugado, el ácido acetilhomotaurínico, es un ácido fuerte (Chabenat y col., 1988). Estos mismos autores investigaron la estabilidad del fármaco en distintos medios, concluyendo que el acamprosato es un compuesto de elevada estabilidad química, por lo que parece extremadamente improbable que, *in vivo* actúe como precursor del aminoácido homotaurina (metabolito potencialmente más probable).

El ^{14}C -acamprosato, utilizado en el presente trabajo de investigación, cuenta en su estructura con el isótopo radiactivo ^{14}C (Figura 1.3) y sus propiedades fisicoquímicas y organolépticas son idénticas a las del producto no marcado.

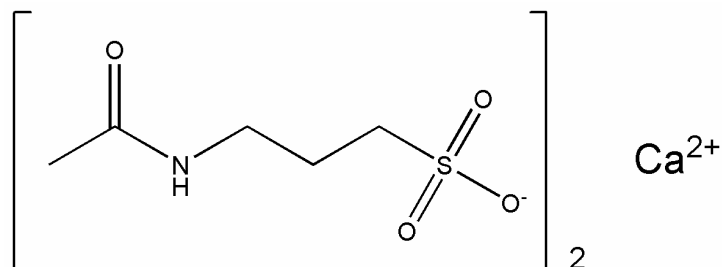


Figura 1.1: Representación gráfica de la estructura del acamprosato.

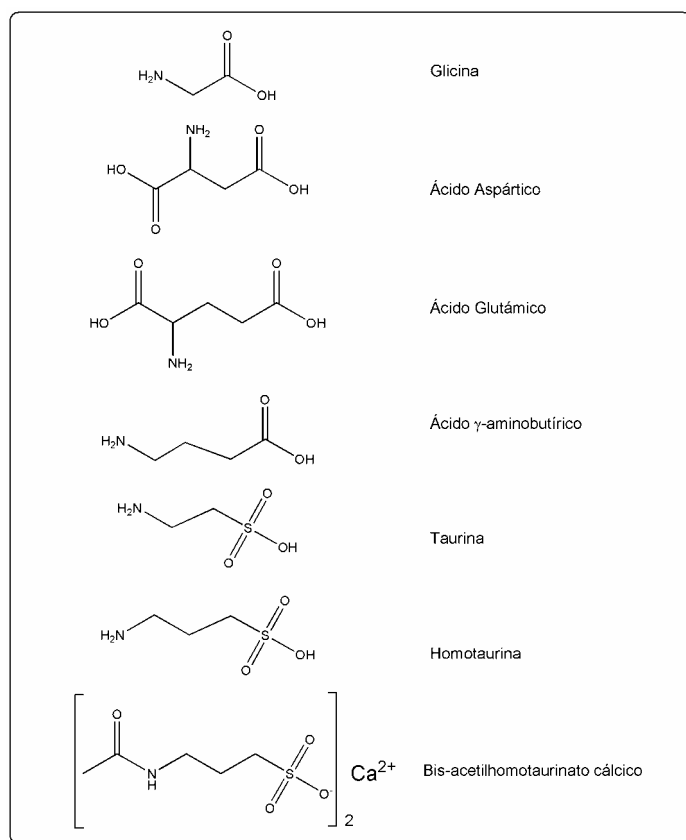


Figura 1.2: Fórmula estructural del acamprosato y de otros aminoácidos estructuralmente relacionados con el mismo.

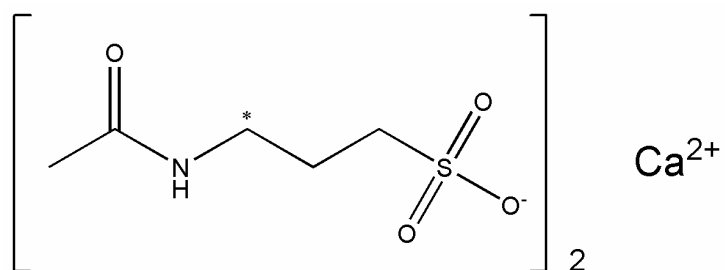


Figura 1.3: Representación gráfica de la estructura del ^{14}C -acamprosato.
*: carbono marcado.

1.1.2 Indicaciones

El acamprosato se utiliza en la terapia de mantenimiento de la abstinencia en pacientes dependientes del alcohol, estando indicado en las siguientes situaciones:

- 1) Bebedores con bajo nivel de motivación y/o bebedores con elevado índice de severidad de su adicción, con el fin de que resulte más confortable el abandono de bebidas alcohólicas.
- 2) Prevención de recaídas tras el cese de consumo.
- 3) Prevención de recaídas en épocas de especial riesgo (vacaciones, situaciones personales conflictivas, etc.)

Al inicio del tratamiento con acamprosato el paciente debe estar abstinente.

1.1.3 Propiedades farmacológicas

El acamprosato es un fármaco de acción central indicado en la terapia de mantenimiento de la abstinencia en pacientes alcohol-dependientes en el contexto de su tratamiento multidisciplinar. Se le atribuye un efecto denominado en terminología anglosajona “anticraving”, es decir, que disminuye el deseo compulsivo por consumir alcohol (Littleton, 1995; Spanagel y Zieglgansberger, 1997). Tanto los estudios realizados en animales como en humanos muestran que el acamprosato no produce aversión por el alcohol (a diferencia del disulfiram), no inhibe los efectos gratificantes del alcohol (a la inversa que naltrexona) y no reemplaza ni potencia los efectos del alcohol (al contrario que los ansiolíticos) (Gewiss y *col.*, 1991). Además, el acamprosato no modifica la concentración de alcohol en sangre (Daoust y *col.*, 1992; Gewiss y *col.*, 1991). Todos estos hallazgos sustentan la hipótesis de que la reducción en

el consumo de alcohol no se debe a la capacidad del acamprosato de modificar los efectos farmacológicos agudos del alcohol (Le Magnen y *col.*, 1987).

1.1.4 Mecanismo de acción

Actualmente, las teorías sobre la dependencia al alcohol apuntan a que dicha dependencia es consecuencia de una alteración a nivel cerebral del equilibrio entre el neurotransmisor inhibitor ácido gamma-aminobutírico (GABA) y el excitador glutamato.

En el sistema nervioso central (SNC) existen ciertos aminoácidos que se comportan como neurotransmisores o neuromoduladores y que, genéricamente, pueden clasificarse como excitadores o inhibidores.

Entre los aminoácidos inhibidores a nivel central se encuentran la taurina y el GABA. A su vez, la homotaurina (ácido 3-amino-propanosulfónico) es un homólogo natural del aminoácido taurina, y ambos están estructuralmente relacionados con el neurotransmisor GABA.

El GABA fue identificado en los años 80 y parece estar involucrado tanto en los efectos que el alcohol ejerce a nivel del sistema nervioso central, como en el síndrome de abstinencia alcohólica. Así, se ha observado que la administración de antagonistas del GABA potencia las convulsiones ocasionadas por el síndrome de abstinencia alcohólica, mientras que los agonistas o las sustancias que incrementan las concentraciones de GABA antagonizan las convulsiones originadas durante dicho síndrome (Goldstein, 1973; Cooper, 1982). También se ha observado que las concentraciones cerebelares de GABA disminuyen tras la alcoholización crónica.

La homotaurina es un agonista del GABA que como consecuencia de su polaridad no puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), por lo que no puede ejercer las acciones comentadas de los agonistas GABAérgicos. Sin embargo, sí lo ejerce el acamprosato, un derivado de la homotaurina al que se le ha modificado su polaridad para mejorar el paso a través de la BHE. Además, el acamprosato posee una estructura similar a la glicina y a los neurotransmisores excitadores, como el aspartato y el glutamato (también precursor del GABA) (*Figura 1.3*).

El mecanismo de acción del acamprosato no está totalmente dilucidado y los estudios al respecto, en ocasiones, no son concordantes. Parece ser que actúa sobre distintos sistemas de neurotransmisión implicados en la dependencia alcohólica y, por tanto, sus acciones a nivel del sistema nervioso central son variadas. En términos generales este fármaco, probablemente, reduce la hiperexcitabilidad neuronal que aparece durante la deshabituación enólica.

Uno de los primeros mecanismos de acción que se sugirieron fue que al aumentar la población de receptores del GABA en el hipocampo de ratas dependientes al alcohol el acamprosato es capaz de restablecer la transmisión y actividad GABAérgica, tal y como demuestran los estudios realizados por Daoust y col., en 1986. Estudios posteriores determinaron que el acamprosato también incrementa los niveles de serotonina (5-hidroxitriptamina) en plasma y en cerebro (Nalpas y col., 1990).

Por otro lado, se ha comprobado que durante la instauración de la dependencia alcohólica, el número de receptores NMDA (N-metil-D-aspartato) (receptor del glutamato) aumenta (Guerri y Grisolia, 1983; Fadda y Rossetti, 1998; Faingold y col., 1998). Este receptor permite la entrada de cationes calcio al citosol produciendo excitación neuronal (Guerri y Grisolia, 1983). De acuerdo con algunos estudios realizados en ratas, el acamprosato actuaría bloqueando estos receptores y por tanto inhibiendo dicha excitación (al Qatari y col., 1998; Zeise y col., 1993; Zeise y col., 1990). Sin embargo, otros estudios sugieren que el acamprosato podría actuar como agonista parcial, incrementando la activación de los

receptores NMDA cuando la concentración de los activadores endógenos es baja, e inhibiendo la activación cuando dichas concentraciones se incrementan (algo similar a lo que sucede durante el síndrome de abstinencia alcohólica) (Naassila *y col.*, 1998; al Qatari *y col.*, 1998). Recientemente, los ensayos realizados en nuestro laboratorio empleando una técnica de microdiálisis *in vivo* en los que se perfundieron distintas soluciones de acamprosato (0.05, 0.5 y 5 mM) en ausencia y presencia de diversos agonistas y antagonistas de los receptores NMDA en el núcleo accumbens de la rata, parecen confirmar que el acamprosato actúa como antagonista de dichos receptores (Cano-Cebrian *y col.*, 2003).

Hay que tener en cuenta que, según algunos autores, el acamprosato también sería capaz de aumentar la liberación de taurina en el núcleo accumbens en ratas alcohol-preferentes, lo que permitiría restablecer su nivel normal, y suprimir así la excitación neuronal típica del periodo de deshabitación (Littleton, 1995).

En resumen, el acamprosato parece restaurar el equilibrio a nivel cerebral entre los neurotransmisores inhibidores y excitadores, principal alteración que aparece durante el alcoholismo.

1.1.5 Farmacocinética

1.1.5.1 Absorción

En general, y de acuerdo con los resultados publicados, puede aceptarse que la absorción intestinal del acamprosato es pobre en magnitud y lenta en velocidad. La biodisponibilidad oral es del 11% y la concentración plasmática terapéutica es de 400 ng/ml, alcanzándose a los 5 días de iniciar el tratamiento. Tras su administración oral, el tiempo que tarda en alcanzar el pico plasmático es de 3 a 8 horas (Ficha Técnica FDA, 2004).

En un estudio farmacocinético realizado por Fourtillan se administró, a 24 voluntarios sanos (varones), acamprosato a distintas dosis y vías de administración, según el siguiente esquema: a) dosis única oral de 2 comprimidos de 333 mg; b) 2 comprimidos de 333 mg tres veces al día durante 7 días (21 dosis); y c) perfusión intravenosa de 666 mg durante 15 minutos. Según los resultados de dicho estudio, la biodisponibilidad oral en magnitud obtenida fue de $11 \pm 1 \%$. Además, los resultados obtenidos en dicho estudio llevaron al autor a proponer la existencia de un fenómeno flip-flop en la farmacocinética del acamprosato, ya que la vida media de eliminación del fármaco administrado vía oral en voluntarios sanos fue mayor (32.7 ± 4.3 horas) que la calculada tras su administración intravenosa (3.2 ± 0.2 horas) (Fourtillan, 1990; citado en Saivin y col., 1998).

Similares resultados se han obtenido en otros trabajos posteriores. En un ensayo realizado en 1991 por Scott G. en el que se administró a 4 voluntarios sanos una solución de 1320 mg de ^{14}C -acamprosato, se recuperó la mayor parte de la radiactividad (88%) en heces y tan solo un 11% en orina. El pico plasmático de radiactividad se alcanzó de 1 a 2,5 horas tras su administración oral (Scott, 1991; citado en Saivin y col., 1998).

Estudios recientes realizados en nuestro laboratorio utilizando un modelo animal (ratas) han revelaron claramente la existencia del fenómeno flip-flop. La vida media terminal obtenida tras la administración del acamprosato vía oral ($0.006 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$) fue considerablemente inferior que la obtenida tras su administración intravenosa ($0.036 \pm 0.003 \text{ min}^{-1}$). Estos resultados demuestran que la pendiente terminal de las curvas de las concentraciones plasmáticas no representa la eliminación sino el proceso de absorción (Zornoza y col., 2003).

Hasta hace relativamente poco tiempo, los datos existentes en la bibliografía referentes al mecanismo de absorción del acamprosato eran escasos e incluso contradictorios. Por ejemplo, Chabenat y col. (1998) establecen que, como consecuencia de sus propiedades fisicoquímicas, el

mecanismo utilizado por el acamprosato para atravesar las barreras biológicas sería mediante la utilización de portadores. Sin embargo, en una revisión publicada posteriormente (Saivin y *col.*, 1998) se sugiere que el acamprosato podría absorberse a nivel intestinal a través de las uniones que existen entre las células epiteliales, es decir, utilizando la vía paracelular. Ninguno de los dos trabajos aporta evidencias experimentales que avalen estas hipótesis, y en esas fechas ni se había caracterizado el tipo de absorción intestinal, ni calculado sus parámetros farmacocinéticos.

Posteriormente, con el objetivo de clarificar el mecanismo y las rutas implicadas en la absorción intestinal del acamprosato y como parte de un estudio completo de la farmacocinética del mismo, nuestro grupo inició un estudio cinético completo en ratas, del que forma parte la presente memoria de investigación, en el que se demostró que el acamprosato se transporta en el yeyuno de rata principalmente por difusión pasiva (Mas-Serrano y *col.*, 2000). Más recientemente, y también en nuestro laboratorio, se ha demostrado mediante una técnica *in situ*, que tensioactivos no iónicos, como el polisorbato 80, no incrementan el transporte intestinal del fármaco, mientras que ácidos grasos de cadena media, como el caprato sódico, sí que lo aumentan. De acuerdo con la literatura, el caprato sódico facilita la absorción de compuestos hidrófilos a través de la ruta paracelular, por lo que probablemente sea esta vía la que utiliza el fármaco para su absorción a nivel intestinal (Zornoza y *col.*, 2003).

En otros estudios realizados por nuestro grupo de investigación con líneas celulares caco-2 se ha observado que, tanto la unión a la monocapa celular como la internalización del acamprosato a la misma fue insignificante, de lo que se deduce que el mecanismo de transporte por el cual el acamprosato se absorbe a nivel intestinal es improbable que se realice mediante proteínas transportadoras intestinales (Zornoza y *col.*, 2004).

1.1.5.2 Distribución

No existen estudios publicados en los que se aborde el análisis detallado de la distribución del acamprosato. El acetil homotaurinato no se une a las proteínas plasmáticas, su volumen de distribución en estado estacionario tras una administración intravenosa es de 19 a 24 litros y es capaz, a pesar de su marcada naturaleza polar, de atravesar la barrera hematoencefálica y acceder, por tanto, al sistema nervioso central (Wilde y Wagstaff, 1997; Durbin y col., 1995).

En el trabajo publicado por Durbin y col. en 1995, se administraron dosis de 100 y 30 mg/kg de ^{14}C -acamprosato por vía oral e intravenosa respectivamente, observándose que la relación del área bajo la curva de niveles cerebrales y niveles plasmáticos fue de 0.17 para la vía oral y 0.19 para la vía intravenosa. Por tanto, los autores concluyen que el acamprosato es capaz de acceder al sistema nervioso central en proporción apreciable (aproximadamente un 18%). Además, en un estudio reciente realizado en animales se ha demostrado que esta distribución a nivel central es homogénea en las principales áreas del cerebro (*Figura 1.4*) (Courtyn y col., 2004).

1.1.5.3 Metabolismo y eliminación

La mayoría del fármaco absorbido se elimina de forma inalterada en orina (11% de la dosis) y su vida media es de 3,2 a 13 horas. El acamprosato que no se absorbe a nivel intestinal es eliminado a través de las heces.

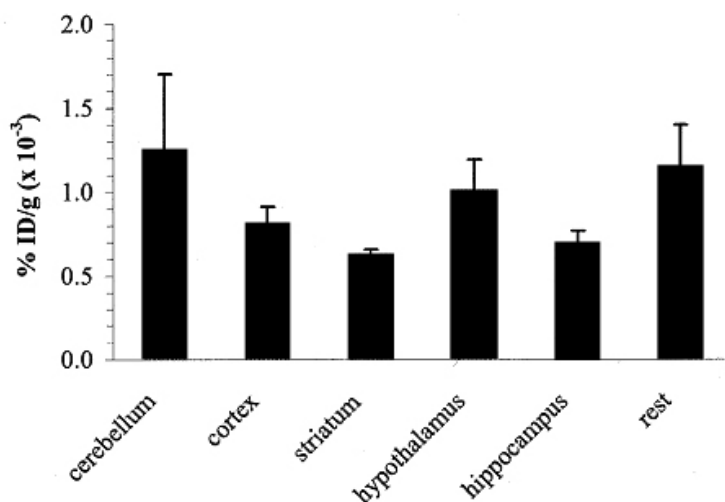


Figura 1.4: Biodistribución de ^{11}C -acetilhomotaurinato en conejos de Nueva Zelanda machos 20 minutos tras su administración intravenosa (tomado de Courtyn y col., 2004). %ID: porcentaje de dosis administrada.

La excreción del acamprosato parece producirse fundamentalmente por vía renal, y diversos autores han postulado la ausencia de rutas metabólicas en la eliminación del acamprosato (Scott, 1991; Dewland, 1991; Fourtillan, 1989; todos citados por Saivin y col., 1998). Sin embargo, existen ciertas discrepancias en el porcentaje de la dosis que se elimina de forma inalterada en la orina.

En este sentido, y de acuerdo con el estudio de Fourtillan (1990), tras la administración de 666 mg de acamprosato en perfusión intravenosa durante 15 minutos a 24 voluntarios sanos, el aclaramiento total fue igual a 15.78 ± 0.72 l/h y el aclaramiento renal a 7.92 ± 1.08 l/h. Es decir, aproximadamente la mitad de la dosis fue eliminada de forma inalterada en la orina.

Sin embargo, otro ensayo realizado con 12 voluntarios a los que se administró distintas dosis (10, 20 y 30 mg/kg) en perfusión intravenosa

durante 10 minutos, concluía que el aclaramiento renal era prácticamente equivalente al aclaramiento total del fármaco (Jaillon y Salvat, 1991).

Esta discrepancia en los resultados obtenidos en ambos estudios puede residir, tal vez, como ha señalado Saivin y col. (1998), en diferencias en el método analítico utilizado.

Posteriormente, en un estudio llevado a cabo por nuestro grupo de investigación en animales (rata), se comprobó que el acamprosato no se metaboliza y que a las 6 horas de su administración intravenosa, el 95% de la dosis es eliminada de forma inalterada en la orina, demostrando que la excreción urinaria es la principal ruta de eliminación de este fármaco (el aclaramiento renal calculado fue similar al aclaramiento total). Por otro lado, en este mismo trabajo se demostró que el acamprosato sufre un proceso de secreción tubular activa, ya que el aclaramiento plasmático renal obtenido fue mayor que la velocidad de filtración glomerular calculada. Además, se observó que el probenecid inhibe de forma competitiva la secreción tubular renal del fármaco e incrementa de forma dosis-dependiente las concentraciones plasmáticas del acamprosato (Zornoza y col., 2002).

1.1.5.4 Edad y sexo

Como consecuencia de que la mayoría de estudios farmacocinéticos con acamprosato se han realizado en varones sanos (Saivin y col., 1998), se realizó un estudio comparativo con voluntarios sanos con el objetivo de evaluar la posible influencia del sexo en la farmacocinética del acamprosato. Para ello se compararon los principales parámetros farmacocinéticos tras la administración oral de una dosis única de 666 mg de acamprosato a 12 voluntarios sanos de cada sexo. Las muestras plasmáticas se recogieron durante 120 horas y la comparación estadística de los parámetros obtenidos no reveló la existencia de

diferencias estadísticamente significativas entre ambos sexos (Dewland, 1995a, citado por Saivin y col., 1998).

No se han llevado a cabo estudios específicos en pacientes ancianos en los que se evalúe la influencia de la edad sobre la farmacocinética del acamprosato.

1.1.5.5 Insuficiencia hepática

Los estudios realizados en pacientes con insuficiencia hepática leve o moderada (Child-Pugh grado A y B; *Cuadro 1.1*) indican que, comparado con voluntarios sanos no existen diferencias en los principales parámetros farmacocinéticos del acamprosato. Sin embargo, no se han publicado estudios farmacocinéticos en pacientes con insuficiencia hepática grave (Child-Pugh grado C), por lo que el acamprosato está contraindicado en este tipo de pacientes (Ficha Técnica FDA, 2004).

CLASIFICACIÓN GRADOS DE CHILD-PUGH			
	1 punto	2 puntos	3 punto
Bilirrubina (mg/dl)	<2	2-3	>3
En CBP	<4	4-10	>10
Albúmina (g/dl)	>3,5	3,5-2,8	<2,8
Índice de Quick (%)	>70	70-40	<40
INR	>1,7	1,8-2,3	>2,3
Ascitis	No	Fácil control	Difícil control o refractaria
Encefalopatía	No	1-2	3-4

Puntuación: Grado A = 5-6 puntos; B = 7-9 puntos; C = 10-15 puntos

CBP: cirrosis biliar primaria; INR: International Normalized Ratio

Cuadro 1.1: Clasificación de los grados de Child-Pugh.

1.1.5.6 Insuficiencia renal

En los estudios llevados a cabo en pacientes con insuficiencia renal moderada (aclaramiento de creatinina: 1,8-3,6 L/h/1,73m²) y grave (aclaramiento de creatinina: 0,3-1,74 L/h/1,73m²) se ha observado que existe una relación lineal creciente entre el aclaramiento de creatinina y el C_{máx}, t_{máx} y la vida media de acamprosato, y decreciente con el aclaramiento total del fármaco. La concentración plasmática máxima observada tras la administración de una dosis única de 666 mg (2 comprimidos de 333 mg) a pacientes con insuficiencia renal moderada y grave es de 2 a 4 veces mayor, respectivamente, que en voluntarios sanos (Saivin y col., 1998; Dietmaier y col., 2001; Overman y col., 2003). Por lo que se recomienda no administrar acamprosato a pacientes con insuficiencia renal grave, y en pacientes con insuficiencia renal moderada administrar una dosis diaria total de 1 gramo, dividido en tres tomas (Ficha Técnica FDA, 2004).

1.1.6 Eficacia

Actualmente existe cierta controversia sobre qué variables se deben utilizar en los ensayos clínicos en los que se evalúan los tratamientos de la dependencia alcohólica. Además, la existencia de diversos factores como son: el diagnóstico del alcoholismo (abuso vs. dependencia), tratamiento en diferentes medios (ambulatorio vs. atención especializada), variabilidad en la cantidad de intervenciones médicas/conductuales realizadas o la utilización de medicación concomitante, complican aún más el estudio de esta patología. Por ejemplo, en los ensayos clínicos que evalúan la eficacia de naltrexona (fármaco antagonista selectivo de los receptores opioides μ , utilizado junto con otras medidas psicoterapéuticas para reducir el deseo de consumo de

alcohol, mantener la abstinencia y reducir el riesgo de recaídas), las variables a estudio utilizadas han sido distintas a las de los estudios con acamprosato, a pesar de que la patología a estudio es la misma. Esta misma discrepancia se ha observado incluso cuando se comparan entre sí los ensayos clínicos realizados con acamprosato. En los ensayos clínicos más antiguos las variables primarias utilizadas (tiempo de abstinencia controlada por el paciente, observación clínica y parámetros bioquímicos normalizados (GGT, volumen corpuscular medio)) han sido distintas a las utilizadas en los ensayos clínicos más recientes (abstinencia total al final de la fase de tratamiento, tiempo transcurrido hasta la ingesta de una bebida alcohólica, tasas de abandono y duración acumulada de la abstinencia) (Overman y *col.*, 2003).

En trece de los dieciséis ensayos clínicos en los que se comparó acamprosato frente a placebo en el tratamiento de la abstinencia alcohólica, los resultados mostraron una mejoría en las principales variables primarias en el grupo de pacientes tratados con acamprosato. Estas diferencias se observaron al mes de tratamiento y se mantuvieron hasta un año tras la finalización del estudio (Overman y *col.*, 2003).

Hasta el momento se han publicado dos ensayos clínicos (Rubio y *col.*, 2001; Kiefer y *col.*, 2003) y un estudio piloto (COMBINE Study Research Group, 2003) (realizado para un posterior ensayo clínico a gran escala) en los que se ha comparado acamprosato vs. naltrexona. En el estudio de Rubio y *col.*, los autores concluyeron que no existían diferencias estadísticamente significativas entre acamprosato y naltrexona para la variable secundaria “tiempo hasta la ingesta de la primera bebida alcohólica”, mientras que para la variable primaria “número de pacientes que volvieron a beber” naltrexona fue estadísticamente superior a acamprosato. Sin embargo, en el estudio de Kiefer y *col.*, los resultados no fueron estadísticamente distintos entre naltrexona y acamprosato, aunque según los autores parece ser que existe una tendencia favorable hacia naltrexona en las variables “tiempo hasta la ingesta de la primera bebida alcohólica” y “tiempo hasta recaída”. Además, en dicho estudio se comparó

la combinación de acamprosato y naltrexona frente a acamprosato, naltrexona o placebo, siendo más eficaz en la variable “tiempo hasta recaída” la combinación de ambos fármacos frente a acamprosato o placebo, pero no frente a naltrexona (Kiefer y *col.*, 2003).

En resumen, la utilización de acamprosato, en el tratamiento farmacológico complementario al tratamiento multidisciplinar del alcoholismo, es más eficaz que placebo, si bien, se necesitan ensayos clínicos a gran escala que nos permitan discernir si acamprosato es más eficaz o presenta ventajas comparado con naltrexona. En cuanto a la utilización de acamprosato asociado a naltrexona, habrá que esperar la finalización del estudio a gran escala COMBINE con el objetivo de poder extraer conclusiones.

1.1.7 Interacciones farmacológicas

De modo general, puede decirse que el acamprosato no presenta interacciones significativas con ninguno de los fármacos que habitualmente se han utilizado en la terapia de mantenimiento de la abstinencia en pacientes dependientes al alcohol, con la excepción de la naltrexona.

El diazepam es un ansiolítico, perteneciente al grupo de las benzodiazepinas, que se utiliza como adyuvante en la terapia para el abandono de la dependencia etanólica. Para evaluar la interacción del acamprosato con esta benzodiazepina se diseñó un estudio con 16 voluntarios sanos divididos en dos grupos iguales. A uno de los grupos se les administró 5 mg de diazepam cada 12 horas durante 7 días, posteriormente, y durante una semana más, se les administró conjuntamente la misma dosis de diazepam y acamprosato 2 gramos al día (dividido en tres tomas). Con un diseño similar, el otro grupo recibió inicialmente sólo acamprosato, y a continuación se añadió diazepam (utilizando las mismas duraciones y dosis). Los parámetros cinéticos del acamprosato, diazepam y nordiazepam (principal metabolito del

diazepam), determinados en los días 7 y 14, no fueron estadísticamente diferentes. Los autores concluyeron que no existía interacción farmacocinética recíproca entre estos tres compuestos (Fourtillan, 1995a, citado por Saivin y col., 1998).

La imipramina es un antidepresivo tricíclico que también se suele asociar frecuentemente al acamprosato en las terapias de deshabituación alcohólica. Utilizando el mismo diseño que el estudio de interacción farmacocinética con diazepam, se realizó un ensayo entre imipramina administrado a una dosis de 50 mg al día y el acetilhomotaurinato cálcico (administrado a la dosis habitual). En dicho trabajo el autor concluye que no existen diferencias clínicas significativas en la cinética del antidepresivo estudiado (Fourtillan, 1995b, citado por Saivin y col., 1998).

También se ha estudiado la posible interacción de acamprosato con otros ansiolíticos como oxazepam o meprobamato sin que se los autores detectaran ningún efecto clínico o indeseable anormal atribuible a una interacción entre los fármacos (Aubin y col., 1995).

Respecto al consumo conjunto de acamprosato con disulfiram, fármaco aversivo del alcohol, tampoco se ha demostrado que dicho fármaco interfiera en la disposición del acamprosato (Dewland, 1995b, citado por Saivin y col., 1998; Besson y col., 1998).

La naltrexona es un antagonista selectivo de los receptores opioides μ (Chang y col., 1979) y, aunque su mecanismo de acción "anticraving" es completamente diferente al del acamprosato, se ha propuesto recientemente la utilización conjunta de ambos fármacos en la prevención de las recaídas del paciente alcohólico (COMBINE Study Research Group, 2003). Este hecho ha obligado a la realización de estudios que evalúen la potencial interacción farmacocinética y farmacodinámica. En un ensayo clínico publicado por Mason y col., doble ciego, aleatorizado, con dosis múltiples y cruzado con tres brazos, 24 voluntarios sanos recibieron la dosis estándar de acamprosato (2 gramos/día) y naltrexona (50 mg/día), administrados solo o en combinación, durante 7 días por condición y con periodos de lavado de 7

días entre tratamientos. Los autores comprobaron que la coadministración de acamprosato y naltrexona incrementa de forma significativa la cantidad y la velocidad de absorción del acamprosato, observándose un aumento del 33% en la $C_{máx}$, una disminución del 33% en el $T_{máx}$ y un incremento del 25% en el AUC del acamprosato (Mason y col., 2002). Así mismo se observó que el acamprosato no modifica los parámetros farmacocinéticos de la naltrexona ni de su metabolito 6- β -naltrexol. En estudios realizados en animales de experimentación se ha observado que fármacos antagonistas de los receptores opioides producen alteraciones a nivel del tránsito gastrointestinal lo que justificaría, posiblemente, el incremento en la fracción absorbida de acamprosato (Krevsky y col., 1990; Aurich y col., 1993). Además, la interacción de naltrexona con los receptores opioides presentes en el intestino podría inducir cambios en la permeabilidad intestinal del acamprosato.

1.1.8 Toxicidad y reacciones adversas

En los ensayos clínicos controlados con placebo con duración igual o inferior a 6 meses, el 8% de los pacientes tratados con acamprosato interrumpieron el tratamiento comparado con el 6% de los pacientes en el grupo placebo. En los estudios con una duración superior a 6 meses se observó una tasa de suspensión de tratamiento del 7% en ambos grupos. Sólo la diarrea se asoció con la interrupción del tratamiento en más del 1% de los pacientes (2% en el grupo tratado con acamprosato vs. 0.7% en el grupo placebo). Otros eventos, incluidos náuseas, depresión y ansiedad, se relacionaron con la interrupción del tratamiento en menos del 1% de los pacientes (Ficha Técnica FDA, 2004).

En el *Cuadro 1.2* se muestran los eventos adversos aparecidos en ensayos clínicos en cualquier grupo de pacientes tratados con acamprosato con una incidencia igual o superior al 3% comparado con el grupo placebo (Ficha Técnica FDA, 2004).

En general, se puede concluir que el acamprosato es un fármaco bien tolerado, siendo la diarrea la reacción adversa más frecuente. Se ha relacionado la aparición de toxicidad a nivel gastrointestinal con la ingesta excesiva de calcio presente en el compuesto (Whitworth y col., 1996).

Carcinogenicidad, mutagenicidad y fertilidad

Se realizó un estudio de carcinogenicidad en ratas Sprague-Dawley, en el que recibieron conjuntamente con la dieta, dosis de 25, 100 ó 400 mg/kg/día (0.2, 0.7 ó 2.5 veces superior a la dosis máxima recomendada en humanos basado en el AUC). Los resultados de este estudio muestran que no existe evidencia de aumento en la incidencia de tumores (Ficha Técnica FDA, 2004).

Todos los estudios tóxico-genéticos realizados con acamprosato fueron negativos. Tampoco se ha observado ningún efecto sobre la fertilidad en animales (ratas y ratones) (Ficha Técnica FDA, 2004).

NÚMERO DE PACIENTES (%) CON EVENTOS ADVERSOS (EA)				
	CAMPRAL® 1332 mg/día	CAMPRAL® 1998 mg/día	CAMPRAL® Combinado ¹	Placebo
Nº pacientes	397	1539	2019	1706
Nº (%) pacientes con un EA	248 (62%)	910 (59%)	1231 (61%)	955 (56%)
Global	121 (30%)	513 (33%)	685 (34%)	517 (30%)
Daño accidental*	17 (4%)	44 (3%)	70 (3%)	52 (3%)
Astenia	29 (7%)	79 (5%)	114 (6%)	93 (5%)
Dolor	6 (2%)	56 (4%)	65 (3%)	55 (3%)
Sistema Digestivo	85 (21%)	440 (29%)	574 (28%)	344 (20%)
Anorexia	20 (5%)	35 (2%)	57 (3%)	44 (3%)
Diarrea	39 (10%)	257 (17%)	329 (16%)	166 (10%)
Flatulencia	4 (1%)	55 (4%)	63 (3%)	28 (2%)
Nausea	11 (3%)	69 (4%)	87 (4%)	58 (3%)
Sistema Nervioso	150 (38%)	417 (27%)	598 (30%)	500 (29%)
Ansiedad**	32 (8%)	80 (5%)	118 (6%)	98 (6%)
Depresión	33 (8%)	63 (4%)	102 (5%)	87 (5%)
Mareo	15 (4%)	49 (3%)	67 (3%)	44 (3%)
Boca seca	13 (3%)	23 (1%)	36 (2%)	28 (2%)
Insomnio	34 (9%)	94 (6%)	137 (7%)	121 (7%)
Parestesia	11 (3%)	29 (2%)	40 (2%)	34 (2%)
Piel y apéndices	26 (7%)	150 (10%)	187 (9%)	169 (10%)
Prurito	12 (3%)	68 (4%)	82 (4%)	58 (3%)
Sudores	11 (3%)	27 (2%)	40 (2%)	39 (2%)

* incluye eventos codificados como "fractura" por el patrocinador; ** incluye eventos codificados como "nerviosismo" por el patrocinador; ¹ incluye todos los pacientes de las dos primeras columnas y a 83 pacientes tratados con acamprosato a la dosis de 3000 mg/día

Cuadro 1.2: Eventos adversos comunicados con una incidencia superior al 3% en cualquier grupo de tratamiento con acamprosato (Campral®) en ensayos clínicos (tomado de Ficha Técnica FDA, 2004).

Efecto teratogénico

Acamprosato ha demostrado ser teratogénico en ratas cuando se administró a dosis aproximadamente igual a la dosis humana (en base a mg/m^2) y en conejos cuando se les administró a dosis que son aproximadamente tres veces la dosis humana (en base a mg/m^2). Las malformaciones incluyeron hidronefrosis, malformación de iris, displasia retinal y arterial. No se observaron hallazgos clínicos cuando se administró a la dosis de 50 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ (aproximadamente un quinto de la dosis diaria máxima recomendada en humanos, en base a mg/m^2). Los hallazgos en animales deben considerarse en relación a los efectos adversos conocidos del etanol en el desarrollo, incluidas las características del síndrome fetal alcohólico (dismorfismo craneofacial, retraso del crecimiento intrauterino y postnatal, retardo psicomotor e intelectual). No se han realizado estudios clínicos controlados adecuados en mujeres embarazadas (Ficha Técnica FDA, 2004).

Un estudio realizado con ratones preñadas a los que se les administró acamprosato por vía oral desde el inicio de la gestación (día 15) hasta el final de la lactancia (día 28 postnatal), mostró un aumento de la incidencia de fetos nacidos muertos a dosis igual o superior a 960 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ (aproximadamente 2 veces la dosis máxima diaria recomendada en base a mg/m^2). No se observaron efectos a la dosis de 320 $\text{mg}/\text{kg}/\text{día}$ (aproximadamente la mitad de la dosis diaria recomendada en base a mg/m^2) (Ficha Técnica FDA, 2004).

1.1.9 Posología y forma de administración

En pacientes cuyo peso es superior a los 60 kg, la dosis diaria total de acamprosato es de 2 gramos administrado tres veces al día (2 comprimidos por la mañana, 2 al mediodía y 2 por la noche), en forma de

comprimidos con recubrimiento gastrointestinal (333 mg de acamprosato por comprimido).

En pacientes con peso inferior a los 60 kg, la posología es de 4 comprimidos recubiertos en tres tomas diarias (2 comprimidos por la mañana, 1 al mediodía y 1 por la noche).

En casos de insuficiencia renal moderada se recomienda administrar una dosis diaria total de 1 gramo dividido en tres tomas.

La duración recomendada del tratamiento es de un año (monografía MERCK, 1997)

1.2 MECANISMOS DE ABSORCIÓN INTESTINAL

La absorción gastrointestinal de fármacos, nutrientes y de xenobióticos en general, supone el paso de éstos a través de un estrato unicelular que separa el lumen intestinal del plasma sanguíneo. Dicha absorción está limitada por la permeabilidad y la capacidad de transporte de iones y nutrientes a través de su membrana lipoidea (Jackson, 1987). Mayoritariamente, la absorción tiene lugar en el intestino delgado, pero en determinados casos y en función de las características estructurales y fisicoquímicas de los compuestos, éstos pueden absorberse también en colon o en estómago.

Se ha demostrado la existencia de dos mecanismos fundamentales de absorción: transporte a través de mecanismos especializados y absorción por difusión pasiva, siendo este último mecanismo el que predomina para la gran mayoría de fármacos.

1.2.1 Mecanismos de absorción pasiva

El proceso de absorción pasiva se realiza a lo largo de todo el tracto gastrointestinal y en especial en el intestino delgado. Existen diversas razones que permiten explicar este predominio:

- 1) la gran superficie de absorción existente (200 m^2), debido a la presencia de estructuras específicas como son los villi y microvilli.
- 2) el alto flujo sanguíneo ($250\text{-}1000 \text{ ml/min.}$), que conlleva un elevado gradiente de concentración entre la luz intestinal y el plasma y, consecuentemente, un aumento de la velocidad de absorción.
- 3) la secreción de bilis, que permite la absorción de lípidos.

La absorción por difusión pasiva se caracteriza por realizarse siempre a favor de gradiente de concentración y sin consumo de energía, (Mayershon, 1995), pudiendo producirse por difusión a través de la bicapa lipídica (vía transcelular) y/o difusión paracelular a través de las uniones estrechas existentes entre enterocitos adyacentes (*Figura 1.5*) (Cano-Cebrian y col., 2005).

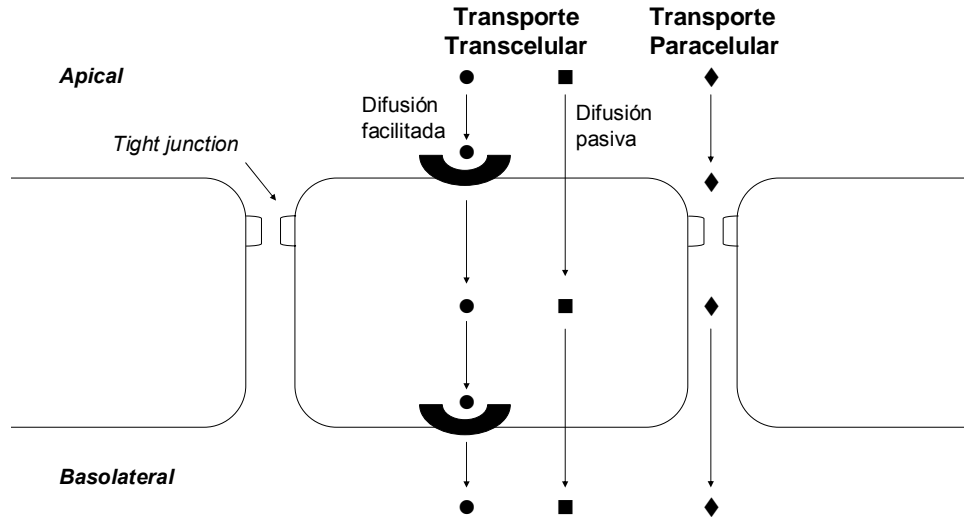


Figura 1.5: Representación esquemática de los distintos mecanismos para atravesar el epitelio intestinal.

La difusión a través de la *bicapa lipídica* (difusión transcelular) es, básicamente, un fenómeno de reparto del fármaco entre el fluido luminal en el que se encuentra disuelto (fase acuosa) y la bicapa lipídica de la membrana (fase orgánica o lipídica). El rendimiento de este proceso depende del pK_a de la sustancia a absorber, del pH del medio a ambos lados de la membrana, del coeficiente de reparto y del coeficiente de difusión. Este proceso se rige por la Ley de Fick expresada por la siguiente ecuación:

Ecuación 1.1

$$\frac{dQ}{dt} = -D \cdot S \cdot \frac{dC}{dx}$$

en la que dQ/dt es la cantidad de soluto que difunde a través de una superficie S de la membrana por unidad de tiempo, D es el coeficiente de difusión de la molécula a través de la membrana y dC/dx el gradiente de concentración, es decir, la variación diferencial de concentración que se establece entre el lumen intestinal y el plasma sanguíneo con respecto al espacio recorrido.

Realizando las transformaciones oportunas en la anterior ecuación y asumiendo una serie de premisas de acuerdo con las condiciones experimentales, se puede expresar la velocidad de absorción como **flujo** (ϕ_t):

Ecuación 1.2

$$\frac{Q}{S \cdot t} = \phi_t = \frac{D \cdot P_v}{\delta} \cdot A$$

definiéndose el **flujo** como la cantidad del fármaco que es transportado o absorbido por unidad de tiempo y superficie. P_v representa el coeficiente de reparto *in vivo* del fármaco, δ el espesor medio de la membrana y A la concentración remanente del fármaco en el lumen intestinal.

Para un mismo lugar de absorción en condiciones estandarizadas (técnica de trabajo, solución de perfusión, animal de experimentación,...) los parámetros anteriores (D , P_v y δ) se engloban en una única constante de velocidad de absorción, $k_{a(t)}$.

Ecuación 1.3

$$\phi_t = k_{a(t)} \cdot A$$

De forma análoga, se puede deducir para la difusión paracelular la expresión:

Ecuación 1.4

$$\phi_p = k_{a(p)} \cdot A$$

Si se considera un compuesto cuyo transporte intestinal puede realizarse por ambos procesos de difusión pasiva, la expresión general representativa de la velocidad de absorción, expresada como **flujo** sería la siguiente:

Ecuación 1.5
$$\phi_{\text{Total}} = \phi_t + \phi_p = (k_{a(t)} + k_{a(p)}) \cdot A$$

De esta manera, el flujo o velocidad de absorción global de un compuesto que se puede transportar por ambos procesos de difusión pasiva, se expresaría de acuerdo con la siguiente ecuación:

Ecuación 1.6
$$\phi = k_a \cdot A$$

1.2.2 Mecanismos de transporte especializado

Se ha observado que existen algunos fármacos que presentan una constante de velocidad de absorción en intestino delgado mayor de la que cabría esperar en función de su lipofilia, tamaño molecular y propiedades fisicoquímicas. En estos casos, el proceso de absorción suele estar mediado por un mecanismo especializado de transporte, en el que el fármaco aprovecha transportadores (de naturaleza proteica) propios de nutrientes o compuestos fisiológicos con los que mantiene una similitud estructural.

Existen distintos tipos de mecanismos especializados de transporte. Uno de ellos es el *transporte activo*. En este caso, el compuesto atraviesa la membrana absorbente contra gradiente de concentración o contra gradiente electroquímico gracias a la intervención de uno o varios sistemas portadores y con consumo de energía. Dichos portadores se caracterizan por: presentar una gran selectividad en su unión a los sustratos, ya que reconocen determinados grupos funcionales de los mismos; ser saturables; y porque el transporte de las moléculas lo realizan en sentido unidireccional.

Otras veces, el mecanismo especializado de transporte es un proceso de *difusión facilitada*. En este caso, aunque existe intervención de portadores, el proceso se realiza a favor de gradiente de concentración y, por tanto, sin consumo de energía.

En el intestino delgado existen diversos sistemas de transporte mediado por portadores para la absorción de nutrientes, de forma que cada sistema de transporte actúa sobre un sustrato específico de estructura química determinada. Existen portadores específicos para la absorción de la mayoría de nutrientes: aminoácidos, péptidos de pequeño tamaño, azúcares, vitaminas, sales biliares, etc. (Ariens, 1975). Estos transportadores son aprovechados por algunos fármacos que poseen estructuras químicas similares a moléculas endógenas para su absorción a nivel intestinal. Por ejemplo, antibióticos β -lactámicos (Sinko y Amidon, 1989), antiespásticos como el baclofeno (Polache y col., 1993; Polache y col., 1991) o antiparkinsonianos como la L-dopa (Sinko y col., 1987).

El proceso de absorción a través de mecanismos especializados de transporte puede describirse a través de la cinética de Michaelis-Menten, que adaptada al proceso de absorción, adquiere la siguiente expresión:

Ecuación 1.7

$$v = \frac{dA}{dt} = \frac{V_m \cdot A}{K_m + A}$$

en la que v representa la velocidad del proceso, V_m la velocidad máxima, K_m la constante de Michaelis-Menten, que equivale numéricamente a la concentración de sustrato para la cual la velocidad de transporte es la mitad de la velocidad máxima (representa la afinidad del compuesto por el portador), y A la concentración de sustrato en el lugar de absorción.

La *Ecuación 1.7* permite diferentes aproximaciones en función de las magnitudes relativas de K_m y A :

- Cuando la concentración en el lugar de absorción es pequeña, A puede despreciarse como sumando en el denominador frente a K_m y la *Ecuación 1.7* se puede expresar del siguiente modo:

Ecuación 1.8

$$-\frac{dA}{dt} = \frac{V_m \cdot A}{K_m} = k_{ap} \cdot A$$

La velocidad del transporte en estas condiciones es proporcional a la concentración de fármaco en el lumen intestinal, por lo que la cinética aparente del proceso de absorción es de orden uno, análoga a la de difusión pasiva, siendo k_{ap} la constante aparente de velocidad de absorción de primer orden.

- Por el contrario, cuando la concentración de fármaco en el medio es elevada, el sistema o sistemas portadores pueden saturarse, ya que su número es limitado, siendo K_m despreciable frente a la concentración remanente de sustancia en el lumen intestinal, con lo que el proceso de absorción se asemeja a una cinética de orden cero, donde la velocidad de absorción es constante e independiente de la concentración de fármaco en la luz intestinal. En este caso la *Ecuación 1.7* puede simplificarse de la siguiente forma:

Ecuación 1.9

$$-\frac{dA}{dt} = V_m \cdot \frac{A}{A} = V_m = k_0$$

en la que k_0 es la constante aparente de velocidad de absorción de orden cero.

Por otra parte, el proceso de absorción de algunas sustancias se realiza simultáneamente por transporte activo y difusión pasiva, en cuyo caso la cinética global del proceso es una combinación de ambas.

Ecuación 1.10

$$-\frac{dA}{dt} = -\frac{V_m \cdot A}{K_m + A} + k_a \cdot A$$

La contribución cuantitativa de cada uno de los procesos a la velocidad de absorción global depende de la concentración de la sustancia en el lugar de absorción. En este sentido, para concentraciones bajas hay una mayor contribución del proceso de absorción mediado por portadores; sin embargo, al aumentar la concentración se satura dicho proceso, adquiriendo mayor peso el proceso de difusión pasiva.

Habitualmente, el mecanismo de absorción especializado a nivel intestinal implica la existencia de ventanas de absorción, que se definen como lugares circunscritos del tracto gastrointestinal en los que se produce una absorción selectiva de determinados fármacos y xenobióticos.

Fenómenos de inhibición

Cuando una determinada sustancia (fármacos o xenobióticos) se absorbe a través de mecanismos especializados de transporte se pueden detectar fenómenos de inhibición en el proceso de unión de la molécula a su sistema portador.

En la absorción intestinal, el mecanismo de inhibición más frecuente es el competitivo. Las moléculas de sustrato y de inhibidor presentan una estructura química similar, de manera que ambas compiten por el mismo sitio de unión al portador. Como el número de portadores es limitado, cuando el inhibidor se une a ellos, se reduce el número de portadores libres a los que unirse el sustrato y, por tanto, se reduce su velocidad de transporte.

El que una sustancia actúe como sustrato o como inhibidor depende de dos factores: de la concentración (a mayor concentración más posibilidades de unirse al portador y menos de ser inhibida su absorción); y de la K_m (a mayor K_m , menor afinidad y menos posibilidades de actuar como inhibidor).

1.3 ETANOL Y SU INFLUENCIA EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL

1.3.1 Introducción

El alcoholismo se define como una enfermedad primaria crónica (consumo de etanol superior a 80 gramos al día durante más de dos años) sobre cuyo desarrollo y manifestaciones influyen múltiples factores.

Desde el punto de vista fisiológico, el *alcoholismo* genera múltiples problemas: alteraciones del sistema nervioso central, trastornos neurológicos y mentales, trastornos hepáticos, cirrosis y alteraciones del tracto gastrointestinal, entre otras. Muchas de estas alteraciones están causadas por la acción directa del etanol o sus metabolitos y otras por la acción indirecta del mismo al modificar la absorción y metabolismo de nutrientes, tóxicos y fármacos.

Hay que tener en cuenta que el tracto gastrointestinal es el primer órgano expuesto a altas concentraciones de etanol. Se ha demostrado que el etanol produce múltiples alteraciones sobre el sistema digestivo. Ello puede traducirse en una posible alteración de la absorción de sustancias fisiológicas y nutrientes y, consecuentemente, en una modificación de la biodisponibilidad de fármacos administrados vía oral, así como la posible alteración de sus efectos farmacológicos. Por ello, y debido a que el alcoholismo afecta con frecuencia a la población adulta y geriátrica que habitualmente sigue tratamientos farmacológicos *crónicos*, son de gran interés los estudios de

caracterización farmacocinética de la absorción de fármacos en pacientes alcohólicos o en proceso de deshabituación alcohólica.

1.3.2 Características farmacocinéticas del etanol

El etanol es un no-electrolito con un bajo peso molecular (46.07 g/mol), siendo su radio molecular de solo 2.6 Å. Su coeficiente de reparto lípido/agua es 0.032. Estas propiedades permiten al etanol difundir rápidamente (Kalant, 1971). Tras una administración oral, el etanol se absorbe rápida y de forma completa por difusión pasiva en el tracto gastrointestinal, y se distribuye a los diferentes órganos del cuerpo en función de su contenido en agua, atravesando con facilidad las barreras hematoencefálica y placentaria. No se une a depósitos ni tiene órganos de preferencia para su almacenamiento.

Como consecuencia de que la absorción del etanol es superior en el intestino delgado que a nivel gástrico, cuando se produce un retraso en el vaciado gástrico (por ejemplo, en presencia de comida), la absorción del alcohol se retrasa (Fleming y col., 2001). Además, se han observado alteraciones en la absorción del etanol en presencia de determinados fármacos. Por ejemplo, la *cimetidina* administrada vía oral incrementa la absorción del etanol mientras que la *cafeína* y el *disulfiram* la inhiben (Seitz, 1985).

El 90-98% del alcohol ingerido sufre metabolización hepática a través de dos oxidaciones sucesivas, primero a acetaldehído y después a acetato. El paso limitante es la primera oxidación, en la que el etanol pasa a acetaldehído. Se han detectado *in vitro* tres sistemas enzimáticos capaces de efectuar dicha oxidación: la *alcohol deshidrogenasa*, la *catalasa peroxisomal* y el *sistema oxidativo microsomal del etanol (MEOS)* (Figura 1.6).

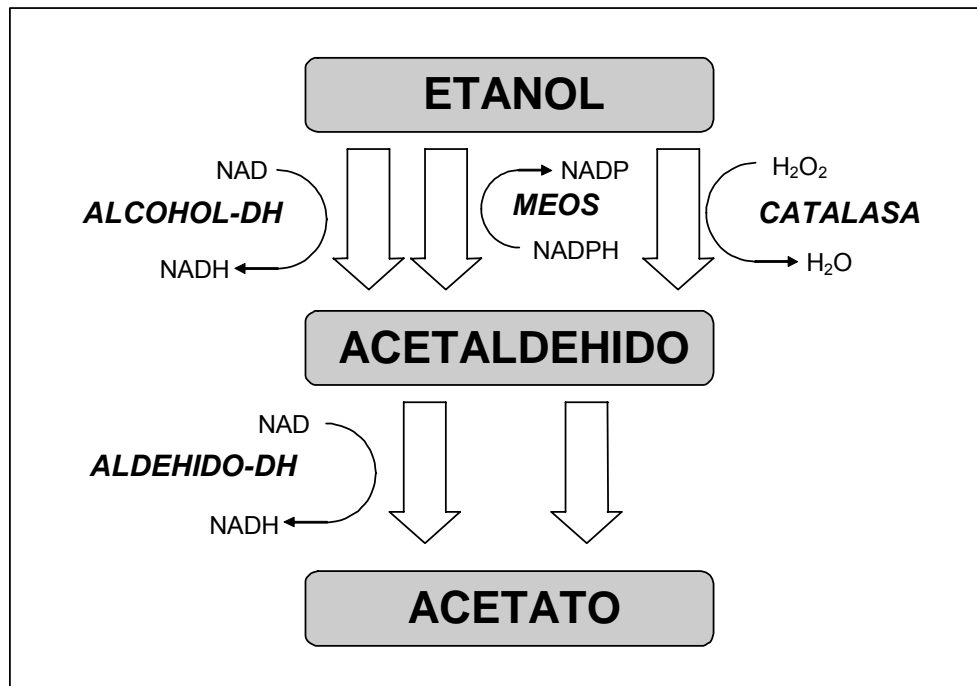


Figura 1.6: Metabolismo del etanol en la célula hepática. ALDEHIDO-DH: aldehído deshidrogenasa; ALCOHOL-DH: alcohol deshidrogenasa; MEOS: sistema oxidativo microsomal del etanol.

La *alcohol deshidrogenasa* posee una baja constante de Michaelis-Menten (K_m), de 0,2 a 2 mM, siendo, por tanto, la principal enzima metabolizante de etanol a bajas concentraciones del mismo (Lieber, 1990). La *catalasa peroxisomal* también oxida el etanol a acetaldehído, pero su importancia *in vivo* parece ser bastante menor (Lieber, 1990; Seitz, 1985). Por último, el MEOS, que utiliza NADPH, O_2 y depende del citocromo P_{450} , posee un papel esencial en la metabolización de concentraciones elevadas de etanol y en el *alcoholismo crónico* debido a su alta K_m (8-10 mM, la mayor de los tres sistemas enzimáticos). Es una enzima autoinducible, y por ello es responsable de cierto grado de tolerancia y de la mayor parte de las interacciones medicamentosas que se observan con el etanol.

El acetaldehído es oxidado por la *aldehído deshidrogenasa* a ácido acético que puede convertirse en acetil-CoA y éste puede oxidarse en el ciclo del ácido cítrico o ser utilizado en las diversas reacciones anabólicas que intervienen en la síntesis del colesterol, los ácidos grasos y otros constituyentes de los tejidos. Es una sustancia muy tóxica y reactiva que produce daños celulares (inhibe la producción de ATP en las mitocondrias), impide la movilización de los ácidos grasos y hace que éstos se depositen en forma de triglicéridos en los hepatocitos, provocando esteatosis. Su concentración plasmática es superior en los pacientes alcohólicos con daño mitocondrial grave.

Entre el 2 y 10% del etanol ingerido se elimina sin metabolizar por la respiración, la orina y el sudor.

1.3.3 El alcoholismo y el estado nutricional

La *cantidad y frecuencia* del consumo de alcohol son los dos principales moduladores de sus efectos sobre el estado nutricional del individuo, por ello, a la hora de estudiar la influencia del alcohol, hay que diferenciar entre el *consumo crónico* de alcohol y la *intoxicación etílica aguda*, pues los efectos que se producen son diferentes.

La mayoría de las bebidas alcohólicas no contienen nutrientes esenciales y solamente aportan **calorías vacías** (1g etanol = 7,1 Kcal.). Como consecuencia, el paciente alcohólico ingiere una menor cantidad de nutrientes que el individuo medio normal y desarrolla lo que se ha llamado **malnutrición primaria**. En consumidores *normales* de alcohol, hasta un 10% de la ingesta calórica diaria puede ser suministrada por etanol, mientras que en *grandes* consumidores de alcohol este suministro puede alcanzar hasta el 50% de la ingesta energética diaria.

La pérdida de peso es un hecho común entre los consumidores *crónicos* de alcohol. La sustitución isocalórica por etanol de hasta el 50% de los carbohidratos en una dieta equilibrada conduce a una pérdida de peso.

Sin embargo, cuando el alcohol se ingiere junto a una dieta normal, se produce un aumento de peso, aunque es menor que el alcanzado por la adición isocalórica de grasas o carbohidratos. De cualquier manera, existe controversia sobre si el consumo en bebedores moderados contribuye al aumento de peso (Seitz y Suter, 1994).

En el *consumidor crónico* se ha descrito también la llamada **malnutrición secundaria**, atribuida a la toxicidad que el etanol ejerce sobre diversos órganos del cuerpo, como hígado, páncreas y tracto gastrointestinal, conduciendo a una peor digestión y una malabsorción de nutrientes, vitaminas y oligoelementos. Esta malnutrición está caracterizada sintomáticamente por gastritis, emesis, diarrea y anorexia.

La malnutrición inducida por el abuso del etanol puede por sí misma provocar alteraciones en múltiples funciones orgánicas y cambios funcionales y morfológicos en el intestino delgado, contribuyendo de esta manera a la toxicidad del etanol. Pero el alcohol puede manifestar su toxicidad no sólo a través de la malnutrición, sino de otros mecanismos directos, como la alteración del metabolismo intermediario (interacción con el metabolismo de nutrientes, fármacos y xenobióticos causada por la prioridad que posee el metabolismo del etanol), la acumulación de acetaldehído y alteraciones fisicoquímicas de las membranas celulares. Este último efecto se podría traducir en una alteración de la absorción a distintos niveles y, en particular, a nivel intestinal.

En el caso de la *intoxicación etílica aguda* se puede producir un daño estructural a nivel de la mucosa intestinal e interferir la absorción de nutrientes y vitaminas, aunque se ha comprobado que la mucosa intestinal revierte por sí misma los cambios estructurales aproximadamente un día después del cese de la ingestión de alcohol (Persson, 1991).

En definitiva, los efectos nutricionales y tóxicos del alcohol con frecuencia están interrelacionados (*Figura 1.7*), y conducen a gastritis alcohólica, disfunción pancreática y hepática, alteraciones del intestino que se manifiestan en forma de anorexia, vómitos, náuseas, esteatorrea con

malabsorción de ácidos grasos esenciales, vitaminas liposolubles y calcio, disminución de las reservas de zinc, vitamina A y B₆, malabsorción de nutrientes y diarrea (Seitz y Suter, 1994).

1.3.4 Alteraciones anatomofisiológicas del tracto gastrointestinal causadas por el etanol

En general, se ha observado que las alteraciones histológicas y citológicas como consecuencia de la ingesta de etanol son poco importantes, contribuyendo poco a las disfunciones gastrointestinales detectadas en el alcoholismo. Muchos autores atribuyen los efectos nocivos del alcohol más bien a los cambios funcionales asociados a su consumo, como son las alteraciones a nivel de la permeabilidad de la membrana absorbente gastrointestinal, la actividad de las enzimas de membrana y el metabolismo celular (Keshavarzian y *col.*, 1994).

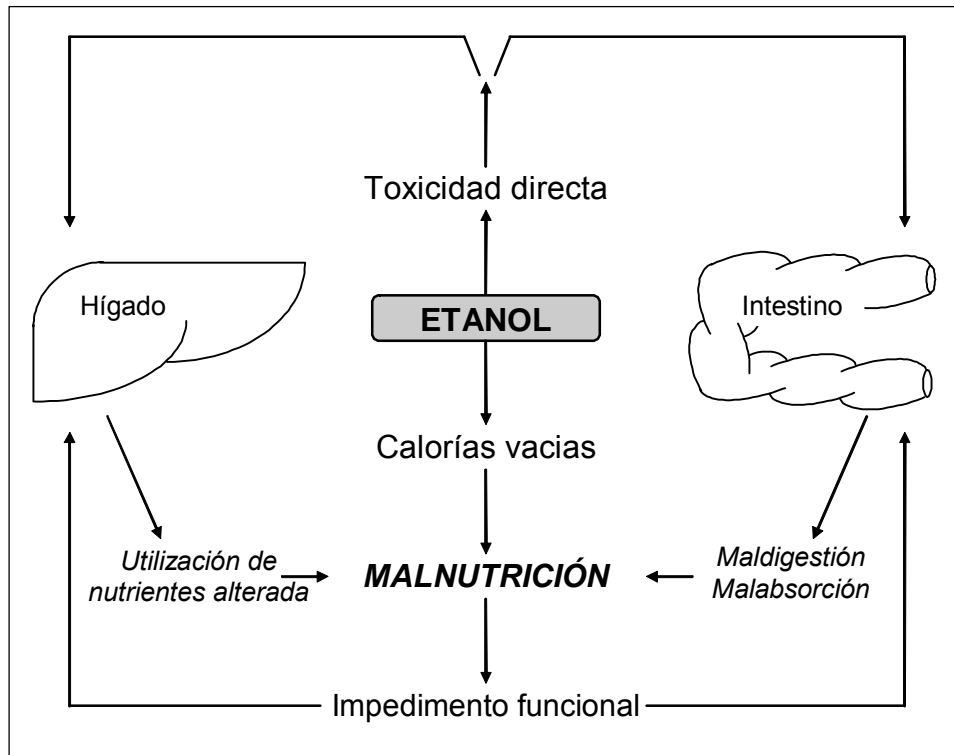


Figura 1.7: Representación esquemática de los efectos nutricionales y tóxicos del etanol que, con frecuencia, están interrelacionados en el alcoholismo

1.3.5 Efectos del etanol sobre la funcionalidad de la membrana intestinal

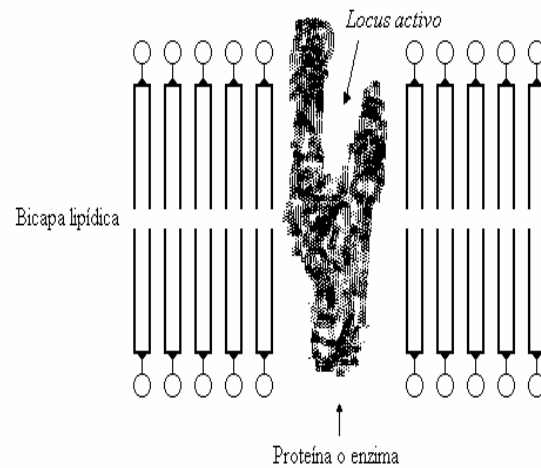
Los estudios que analizan los efectos que el etanol ejerce sobre las membranas, en general, son de complicada interpretación debido a que posiblemente actúe a diferentes niveles, siendo estos efectos difíciles de deslindar. La mayoría de ellos se deben a la interacción directa de las moléculas de alcohol con los distintos componentes de las membranas.

Tal y como se representa en la *Figura 1.8*, las moléculas de etanol se insertan tanto en el exterior como en el interior hidrofóbico de la bicapa. Los grupos metílenos de las moléculas de etanol se localizan en regiones hidrofóbicas de la membrana, como son la porción apolar de las moléculas lipídicas, las interfases apolares entre lípidos y proteínas o las regiones hidrofóbicas de las proteínas (Wilson y Hoyumpa, Jr., 1979).

Los efectos que el etanol ejerce sobre la membrana se manifiestan fundamentalmente en la alteración de la actividad de las proteínas de la membrana (enzimas, transportadores, receptores) y, por tanto, en la funcionalidad de la célula. Algunos autores opinan que esta alteración de la actividad de las proteínas puede ser consecuencia de cambios conformacionales, es decir, de la alteración de la estructura terciaria de las proteínas (*Figura 1.8*) (Wilson y Hoyumpa, Jr., 1979; Reitz, 1993).

En resumen se podría indicar que, a nivel intestinal, la interacción del etanol con la membrana del enterocito se traduciría en alteraciones de la fluidez, polaridad y, por tanto, de la difusión o absorción de los distintos compuestos a su través.

Membrana



Membrana + Etanol

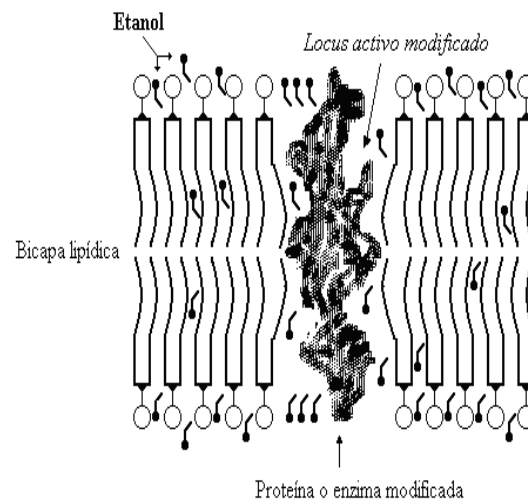


Figura 1.8: Representación esquemática de la posible interacción de las moléculas de etanol con los lípidos y proteínas de la membrana del intestino delgado (Wilson y Hoyumpa, Jr., 1979).

1.3.5.1 Efectos del etanol sobre la permeabilidad de la membrana

Se ha observado que en eritrocitos, neuronas, microsomas hepáticos y mitocondrias la exposición *aguda* de etanol aumenta la fluidez de las membranas. En estas membranas, sin embargo, la fluidez vuelve a la normalidad después de una exposición *crónica* como consecuencia de cambios adaptativos en la composición de la misma (Bjorkman y Jessop, 1994). Este proceso, llamado adaptación homeoviscosa, que aparece en el *alcoholismo* ha sido sugerido como un potencial mecanismo en la tolerancia al etanol y es esencial para la existencia de una permeabilidad normal y para la actividad de las enzimas de la membrana. Esta adaptación se ha relacionado con un aumento en el contenido en ácidos grasos de cadena larga y de colesterol, lo que conlleva una mayor rigidez de la membrana con respecto a su estructura normal (Chin y Goldstein, 1981).

En lo referente a la membrana de las células intestinales, los resultados obtenidos en un estudio realizado en ratas han permitido postular a los investigadores la ausencia de cambios adaptativos a este nivel ya que la ingesta crónica de etanol no previene los efectos *agudos* (aumento de la fluidez de la membrana y descenso del contenido en colesterol). Según estos autores, esta carencia de adaptación explicaría los efectos persistentes en la absorción (malabsorción de nutrientes), característicos de la población alcohólica crónica (Bjorkman y Jessop, 1994).

Por otra parte, en animales de experimentación se ha comprobado que la administración *aguda* de etanol favorece la penetración de macromoléculas como la *albúmina sérica*, la *peroxidasa* y la *γ-globulina*, al producirse una desestabilización de las uniones compactas o estrechas existentes entre las células columnares de los villi ya descritas (Wilson y Hoyumpa, Jr., 1979; Persson, 1991). Lo mismo parece ocurrir en el *alcoholismo crónico* (Bjarnason y col., 1985), lo que facilitaría la absorción de macromoléculas por vía paracelular. *Ma y col.* también observaron que el aumento en la permeabilidad paracelular inducida por el etanol es debido en

parte a una desorganización de los microfilamentos de actina, lo que produciría una desintegración de los complejos de unión intercelular con apertura de las vías paracelulares; este efecto es reversible tras la eliminación del etanol, produciéndose una reorganización de los citados microfilamentos (Ma y col., 1999).

Este deterioro de la barrera intestinal puede facilitar el paso a la sangre de sustancias tóxicas de alto peso molecular (antígenos, toxinas exógenas) que en condiciones normales no se absorberían, a causa de las cuales se producirían las lesiones locales y reacciones inmunes que se observan en muchos pacientes alcohólicos (alergias alimentarias, urticarias) y que suelen desaparecer tras un breve período de desintoxicación.

Robinson y col. comprobaron que la ingestión *aguda* de etanol produce un aumento reversible en la absorción del polietilenglicol-400, el cual penetra en el enterocito tanto por difusión simple a través de membrana como por vía paracelular, aunque el mecanismo responsable del aumento de absorción (difusión lipoidea o penetración por vía paracelular) no ha sido completamente demostrado (Robinson y col., 1981).

En este sentido, existen indicios que abogan por la existencia de un *aumento de permeabilidad de la membrana lipoidea* de los enterocitos debida al *alcoholismo crónico*.

En un estudio realizado en ratas, en el que se analiza los efectos del *alcoholismo* en la absorción intestinal de una serie homóloga de análogos del ciprofloxacino, se ha observado que la permeabilidad de los análogos más hidrofílicos se ve incrementada en los animales sometidos a un tratamiento *crónico* con etanol respecto al grupo control, mientras que los análogos más lipófilos se absorben a la misma velocidad en ambos grupos. Este hecho se ha interpretado como un aumento en la polaridad de la membrana lipídica intestinal de los animales *alcohólicos*, sin que se afecte la integridad de la capa acuosa estática adherida a la membrana por su cara luminal (Merino y col., 1997). Esto explicaría que sustancias hidrofílicas con una absorción limitada por su difusión a través de la membrana, aumenten su absorción en animales sometidos a una administración crónica de etanol, mientras que

sustancias de lipofilia moderada o alta mantengan su absorción respecto a los controles.

Keshavarzian y col. demostraron, en un estudio con pacientes *alcohólicos* en el que utilizaron *lactulosa* como modelo de absorción de la vía paracelular, que la permeabilidad de esta molécula no se modificaba (*Keshavarzian y col.*, 1994), en contraste con los resultados en los que se utilizaba ^{51}Cr -EDTA como modelo. De acuerdo con los autores, esta discrepancia podría explicarse admitiendo que la absorción de lactulosa no se modifica y que la vía paracelular, en caso de existir, no es suficientemente operativa como para que se observe un aumento en la penetración del compuesto.

Como resumen de lo expuesto hasta ahora, se deduce que la acción del alcohol sobre la permeabilidad de la mucosa se debe principalmente a un efecto directo local más que a un efecto sistémico. Además, parece ser que las alteraciones de la permeabilidad son atribuibles a *modificaciones funcionales* más que estructurales de las células columnares, pese a lo cual dichos cambios podrían justificar la mayor incidencia de infecciones y otros procesos patológicos que se observan en la población alcohólica respecto a la normal (*Keshavarzian y col.*, 1994).

1.3.6 Influencia del etanol sobre la absorción intestinal de fármacos

Comparado con los estudios realizados de interacción del etanol a nivel metabólico, la influencia que ejerce el alcohol sobre la absorción gastrointestinal de fármacos ha sido poco estudiada, tanto en voluntarios sanos como en pacientes alcohólicos.

Los fármacos, al igual que otras sustancias, poseen principalmente dos posibles mecanismos de absorción: la difusión pasiva a través del borde en cepillo de los enterocitos, que podría afectarse por la posible alteración de la membrana de los microvilli; y el transporte especializado, el cual podría

verse modificado por la interacción del etanol con los sistemas transportadores (Polache y col., 1996; Martín-Algarra y col., 1998). El mecanismo mayoritario es, con mucha diferencia, la absorción pasiva.

El estudio de la influencia del etanol en la absorción de los fármacos en ensayos *in vivo*, tanto en animales como en humanos, se interpretan exclusivamente desde el punto de vista farmacocinético, a partir de los datos de niveles plasmáticos y de excreción de metabolitos. Por tanto, es difícil deslindar la influencia del alcohol en la absorción de los fármacos de la que tiene lugar en los procesos de disposición.

Entre los trabajos que han analizado el efecto del etanol en la absorción de fármacos, Sellman y colaboradores demostraron que las concentraciones plasmáticas de diazepam, administrado por vía oral en pacientes alcohólicos, son significativamente inferiores a los del grupo control. Según los autores estas diferencias podrían atribuirse tanto a un incremento en el metabolismo como a una reducción de la absorción. Sin embargo, en el mismo estudio se observó que cuando se administraba un bolus intravenoso de diazepam las concentraciones plasmáticas del fármaco seguían siendo inferiores que las obtenidas en el grupo control, de lo que se deduce que el efecto del etanol sobre el diazepam se debe a una mayor biotransformación del mismo (Sellman y col., 1975).

Resultados similares han obtenido otros autores estudiando la fenitoína, observándose que el etanol incrementa el metabolismo del fármaco (Kater y col., 1969).

Sin embargo, ensayos realizados en ratas *alcoholizadas* (ingesta de alcohol durante 15, 30 y 120 días), sí que han demostrado una disminución en la velocidad de absorción de antihelmínticos como el **albendazol** y **mebendazol**, respecto a los animales *control* (Justel y col., 1994).

También se ha observado en ratas *alcohólicas* una reducción del transporte de antibióticos como **cefalexina** y **cefadroxilo**. Dicha disminución parece asociarse a una inhibición a nivel de los transportadores inducida por el etanol (Barrio Lera y col., 1991).

Como se ha comentado anteriormente, se ha demostrado que la velocidad de absorción del **ciprofloxacino** y de sus análogos más hidrófilos (quinolonas antibacterianas) es mayor en el grupo de animales (ratas) sometidos a un tratamiento crónico con etanol comparado con el grupo control, mientras que los análogos más lipófilos se absorben a una velocidad similar en ambos grupos. Puesto que los fármacos altamente hidrófilos generalmente no se biotransforman, podría esperarse que la biodisponibilidad sistémica de los mismos se incremente significativamente en los casos de *alcoholismo crónico* (Merino y col., 1997).

En resumen, se podría concluir que los efectos del *alcoholismo* en la absorción de los fármacos están poco estudiados y que los escasos datos disponibles hasta el momento son dispares.

1.4 OBJETIVOS

La presente Memoria se enmarca dentro de un proyecto de investigación titulado: "Optimización de la farmacoterapia de la dependencia alcohólica con acamprosato: estudio de los mecanismos de absorción y eliminación del fármaco. Estrategias para la mejora de las pautas posológicas".

Los objetivos perseguidos con la realización de los experimentos presentados en la presente Memoria fueron los siguientes:

1. Determinar los parámetros característicos de la cinética de absorción del acamprosato en solución acuosa en el tramo medio del intestino delgado de rata, mediante la utilización de una técnica *in vitro*.
2. Evaluar la posible participación de portadores intestinales en la absorción del acamprosato.
3. Evaluar la influencia del alcoholismo crónico y del tipo de dieta (sólida frente a líquida) en la absorción del acamprosato.

Capítulo 2: Materiales y Métodos

2.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Como animal de experimentación se ha utilizado la rata albina macho de raza Wistar, con un peso comprendido entre 220-280 g, criada en nuestro estabulario en perfectas condiciones de higiene, climatización (23 ± 1 °C), humedad (60 %) y con ciclos de luz/oscuridad (12/12 h).

Los animales se han distribuido aleatoriamente en tres grupos en función de la dieta administrada:

- 1.- *Grupo Control*: constituido por animales alimentados con dieta líquida (dieta líquida control).
- 2.- *Grupo Crónico*: formado por animales alimentados con una dieta líquida que contiene un 5% (v/v) de etanol (dieta líquida alcohólica).

3.- *Grupo Sólido*: constituido por animales alimentados con dieta sólida convencional (dieta sólida control).

La composición de las dietas en principios inmediatos y alcohol, expresada como porcentaje de calorías respecto a las totales, de los tres grupos ensayados, se detalla en el *Cuadro 2.1*.

COMPOSICIÓN CALÓRICA DE LAS DIETAS			
Principio Inmediato	% Calorías		
	<i>Control</i>	<i>Crónico</i>	<i>Sólido</i>
<i>Proteínas</i>	18	18	22
<i>Lípidos</i>	21	21	9
<i>Hidratos de carbono</i>	61	25	69
<i>Etanol</i>	--	36	

Cuadro 2.1: Composición de las dietas en principios inmediatos y alcohol, expresado como porcentaje de calorías respecto a las totales.

2.1.1 Dieta líquida

Los animales de los grupos *Control* y *Crónico* han sido alimentados con una dieta líquida, basada en la formulada por Lieber y DeCarli, la cual proporciona todos los requerimientos nutricionales necesarios para un desarrollo normal y cuya composición se muestra en el *Cuadro 2.2* (Lieber y DeCarli, 1994). Esta dieta permite eludir los efectos de malnutrición ligados al consumo de etanol, y por tanto, estudiar los efectos tóxicos que posee por sí mismo.

COMPOSICIÓN CUANTITATIVA DE LAS DIETAS LÍQUIDAS		
	Dieta Control	Dieta Alcohol
<i>Caseína</i>	41.4 g	41.1 g
<i>L-Cistina</i>	0.65 g	0.65 g
<i>DL-Metionina</i>	0.4 g	0.4 g
<i>Aceite de oliva</i>	2.1 ml	2.1 ml
<i>Aceite de maíz</i>	0.652 ml	0.652 ml
<i>Tween 80</i>	0.150 ml	0.150 ml
<i>Mezcla de vitaminas</i>	4 g	4 g
<i>Mezcla de sales</i>	10 g	10 g
<i>Gum-Xanthan</i>	2 g	2 g
<i>Colina</i>	2 g	2 g
<i>Cloruro de zinc</i>	0.0164 g	0.0164 g
<i>Celulosa</i>	12 g	10 g
<i>Dextrina</i>	42.48 g	8.8 g
<i>Maltosa</i>	10.62 g	2.2 g
<i>Sacarosa</i>	36.52 g	10.5 g
<i>Sacarina</i>	1 g	1 g
<i>Etanol sin indicador</i>	---	50 ml
<i>Agua c.s.p.</i>	1 L	1 L

Cuadro 2.2: Composición de las dietas líquidas control y alcohol.

Se ha utilizado leche en polvo, (comercializada por Central Lechera Asturiana®), entera y desnatada a partes iguales, cuya composición es la siguiente: 15% materia grasa, 45% lactosa y 30% proteínas.

La mezcla de vitaminas utilizada se adquirió de la empresa I.C.N. Nutritional Biochemical. Su composición en mg/kg es la siguiente:

COMPOSICIÓN DE LA MEZCLA DE VITAMINAS (expresado en mg/kg)	
<i>Concentrado de vitamina A (200000 U/g)</i>	4.5
<i>concentrado de vitamina D (400000 U/g)</i>	0.25
<i>α-Tocoferol</i>	5
<i>Ácido ascórbico</i>	45
<i>Inositol</i>	5
<i>Clorhidrato de colina</i>	75
<i>Menadiona</i>	2.25
<i>Ácido p-aminobenzoico</i>	5
<i>Niacina</i>	4.5
<i>Riboflavina</i>	1
<i>Clorhidrato de piridoxina</i>	3
<i>Ácido fólico</i>	0.09
<i>Biotina</i>	0.02
<i>Vitamina B₁₂</i>	0.135

Como mezcla de sales se utilizó la Sal Hegsted, de I.C.N. Nutritional Biochemical, cuya composición en porcentaje (%) es la siguiente:

COMPOSICIÓN DE LA SAL HEGSTED (expresado en %)	
<i>Carbonato cálcico</i>	29.27
<i>Fosfato bipotásico</i>	32.22
<i>Fosfato monocálcico</i>	7.49
<i>Sulfato magnésico</i>	10.19
<i>Cloruro sódico</i>	16.76
<i>Citrato férrico</i>	2.74
<i>Yoduro potásico</i>	0.079
<i>Sulfato de manganeso</i>	0.49
<i>Sulfato de cobre</i>	0.029
<i>Cloruro de zinc</i>	0.024

2.1.1.1 Grupo Control

Los animales de experimentación pertenecientes al grupo *Control* han sido alimentados con la dieta líquida control durante un período de dos semanas. La cantidad de alimento suministrado a este grupo fue la misma que la ingerida por el grupo *Crónico*.

2.1.1.2 Grupo Crónico

Los animales asignados al grupo *Crónico* fueron sometidos a la dieta líquida alcohol, la cual es de idéntica composición que la dieta líquida control pero adicionada de un 5% (v/v) de etanol. Para que ambas dietas sean isocalóricas, se ha eliminado la cantidad de hidratos de carbono equivalente a las calorías aportadas por el etanol (36% de las calorías totales) (*Cuadro 2.2*). A cada rata se le suministró *ad libitum* dieta líquida alcohol durante cuatro o cinco semanas. Tras este período se considera que las ratas han alcanzado un estado de alcoholización crónico (Sancho-Tello y col., 1988). El tratamiento de alcoholización de los animales se ha realizado gradualmente (Said y col., 1990).

2.1.2 Dieta Sólida

Con el objeto de determinar la posible influencia del tipo de dieta en la absorción del acamprosato se ha establecido un grupo de animales denominado grupo *Sólido*. Este grupo se ha alimentado con dieta sólida (Rats & Souris Entretien "A 04") y agua *ad libitum*.

2.2 DISOLUCIONES DE ENSAYO

2.2.1 Disolución base

Es una disolución inicial o madre, a partir de la cual se preparan todas las disoluciones necesarias para el ensayo. La preparación debe ser extemporánea. Su composición es la siguiente:

<i>Disolución Base</i>	
NaCl (0.89 M)	150 mL
CaCl ₂ (0.52 M)	3 mL
Tampón HEPES (pH=7.3)	100 mL
MgSO ₄ (0.2 M)	3 mL
H ₂ O c.s.p.	1000 mL

2.2.2 Disolución nutritiva

Se prepara a partir de la disolución base añadiendo D-glucosa y de acuerdo con la siguiente composición:

<i>Disolución Nutritiva</i>	
D-Glucosa	0.9 g
Disolución Base c.s.p.	1000 mL

La disolución nutritiva se emplea como solución de lavado del intestino, una vez éste ha sido extirpado y seccionado longitudinalmente, y como disolución regeneradora del tejido intestinal durante el período de incubación previo al ensayo (ver apartado 2.3.3 *Descripción del proceso*

completo). También se utiliza como base o disolvente para la elaboración de las disoluciones de perfusión del fármaco a ensayar.

2.2.3 Disoluciones de acamprosato

Para caracterizar la cinética del acamprosato en los distintos grupos de animales de experimentación se han utilizado las siguientes disoluciones de ensayo:

CONCENTRACIONES DE LAS DISOLUCIONES DE ACAMPROSATO (μM)		
Grupo Control	Grupo Crónico	Grupo Sólido
80000	80000	80000
40000	40000	40000
25000	25000	25000
15000	15000	15000
10000	10000	10000
5000	5000	5000
2500	2500	2500
1000	1000	1000
600	--	--
100	100	100
--	--	25
10	10	10

A estas disoluciones de perfusión se les adiciona una cantidad adecuada de manitol ($M=182.2$ g/mol) con el fin de que todas posean la misma osmolaridad. Este requisito es recomendable, aunque no es imprescindible, debido al corto tiempo que la disolución está en contacto con la mucosa intestinal (Munck y *col.*, 1994).

Una vez preparadas las disoluciones de perfusión, se separa en tubos de ensayo la cantidad exacta de cada una de ellas que se va a utilizar en el ensayo de absorción. Posteriormente en cada tubo se adicionan los compuestos radiactivos en la cantidad adecuada que permita la detección de radiactividad mediante un contador de centelleo en fase líquida.

Los isótopos que se utilizan son el ^{14}C y ^3H :

- ^{14}C -Acamprosato con el que se evalúa la cantidad de fármaco absorbido en un intervalo de tiempo (suministrado por LIPHA),
- ^3H -Polietilenglicol-4000 (^3H -PEG-4000) el cual, debido a su alto peso molecular no atraviesa la membrana intestinal y se emplea para cuantificar el volumen de disolución remanente entre los villi y microvilli y realizar las correcciones oportunas (suministrado por A.R.C., American Radiolabeled Chemicals). Este volumen remanente de disolución contiene el fármaco marcado que no ha sido transportado y que, por tanto, “contamina” la muestra de tejido intestinal (Munck y col., 1994).

Las actividades específicas de los compuestos marcados se indican a continuación:

ACTIVIDADES ESPECÍFICAS	
Sólido de ^{14}C -Acamprosato	90 mCi / mmol
Sólido de ^3H -PEG-4000	1.3 mCi / mg

2.2.4 Disoluciones de acamprosato en los estudios de inhibición

Para los estudios de inhibición de la absorción de acamprosato se preparan disoluciones de acamprosato que a su vez contienen otras sustancias (glicina, prolina, ácido gamma-aminobutírico (GABA) y taurina), que podrían modificar el transporte de acamprosato a través de la membrana del microvilli. Las disoluciones utilizadas se detallan a continuación:

- Acamprosato 1000 μM + Glicina 40 mM
- Acamprosato 1000 μM + Prolina 40 mM
- Acamprosato 1000 μM + GABA 40 mM
- Acamprosato 1000 μM + Taurina 40 mM
- Acamprosato 100 μM + GABA 40 mM
- Acamprosato 100 μM + Taurina 10 mM
- Acamprosato 100 μM + Taurina 20 mM
- Acamprosato 100 μM + Taurina 40 mM
- Acamprosato 100 μM + Taurina 80 mM
- Acamprosato 100 μM + GABA 40 mM + Taurina 40 mM

Por último, con el objetivo de evaluar el efecto del catión sodio (Na^+) en el transporte del acamprosato, se emplearon disoluciones de acamprosato a la concentración de 100 μM elaboradas a partir de una modificación de la disolución base de modo que se obtienen disoluciones libres de dicho catión.

La composición de la disolución base modificada es la siguiente:

Disolución Base	
Cloruro de colina (0.89 M)	150 mL
CaCl ₂ (0.52 M)	3 mL
Tampón HEPES (pH=7.3)	100 mL
MgSO ₄ (0.2 M)	3 mL
H ₂ O c.s.p.	1000 mL

2.2.5 Disolución de manitol

La disolución de manitol usada en los ensayos tiene como objetivo detener el transporte de fármaco a través de la membrana intestinal. Para ello se utiliza una concentración isotónica, de 300 mM, a una temperatura de 4 °C (Munck y col., 1994).

2.2.6 Disolución de ácido nítrico

Se utiliza una disolución de ácido nítrico a la concentración de 0.1 N. Esta disolución, en contacto con el tejido intestinal obtenido tras el ensayo y después de un periodo de agitación, permite la extracción del fármaco y del ³H-PEG facilitando su posterior cuantificación.

2.2.7 Líquido de centelleo

Como líquido de centelleo se ha utilizado un “cóctel” de alta seguridad para muestras acuosas y no acuosas: OptiPhase ‘HiSafe’[®]

(Wallac Scintillation Products). No está sometido a la reglamentación de líquidos inflamables y es biodegradable.

2.3 ENSAYO DE ABSORCIÓN *IN VITRO*

El estudio de la cinética de absorción intestinal del acamprosato, en los distintos grupos de animales, se ha realizado mediante ensayos de absorción *in vitro*, utilizando el tramo medio del intestino delgado de rata. Estos ensayos permiten cuantificar el flujo instantáneo del fármaco a través del borde en cepillo de los enterocitos para cada una de las condiciones y de las concentraciones ensayadas. Esta técnica *in vitro* está basada en la descrita por Schultz y col. (Schultz y col., 1967).

2.3.1 Cámara de incubación

El ensayo de absorción se lleva a cabo en el interior de una cámara de metacrilato (*Figura 2.1*) que consta de los siguientes elementos:

- Dos orificios frontales (*elemento G de la Figura 2.1*) que permiten el acceso al interior de la misma, para la manipulación de las placas y muestras durante el ensayo.
- Un sistema de calefacción de tiro forzado de aire (*elementos D y E de la Figura 2.1*) que logra mantener la temperatura óptima de trabajo de 37°C en el interior de las placas de metacrilato (*elemento C de la Figura 2.1*) (ver apartado 2.3.2 Placas) usadas en el ensayo gracias a la incorporación de un sistema de control de la temperatura. Dicho sistema consta de una sonda térmica (*elemento B de la Figura 2.1*) y de una pantalla (*elemento A de la Figura 2.1*) en la que se controla visualmente la temperatura.

- Un sistema de oxigenación (*elemento H de la Figura 2.1*) permite, durante el tiempo de ensayo, mantener el intestino en perfectas condiciones de oxigenación.
- Un cronómetro situado al lado de la pantalla de la temperatura (*elemento A de la Figura 2.1*) y que se puede accionar y detener mediante pedal (*elemento F de la Figura 2.1*), permitiendo el control estricto del tiempo.

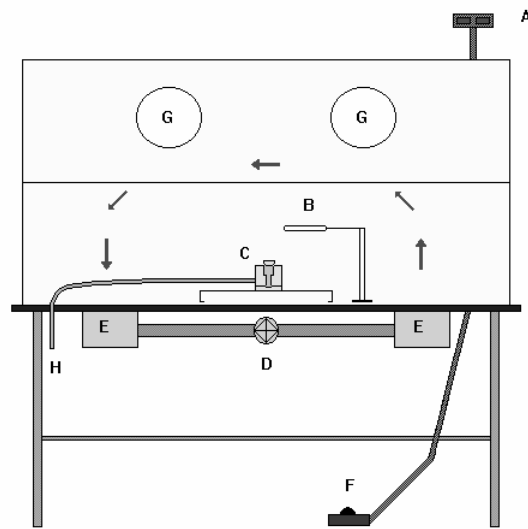


Figura 2.1: Representación esquemática de la cámara de incubación y sus accesorios. A: Panel de la temperatura y tiempo; B: Sonda térmica; C: Placa de ensayo; D: Turbina de aire; E: Entrada y salida de aire; F: Pulsador del cronómetro; G: Acceso al interior de la cámara; H: Entrada de oxígeno

Antes de la realización del ensayo se debe preparar y acondicionar la cámara de incubación. El sistema de calefacción se debe conectar 30 minutos antes de comenzar el ensayo para atemperar la cámara, las placas y la solución nutritiva.

2.3.2 Placas

Las placas usadas en esta técnica *in vitro* están compuestas por dos piezas de metacrilato, una superior y otra inferior que encajan perfectamente. Cada placa posee cuatro pocillos, con una capacidad aproximada de 3 mL y un radio de 0.33 cm. Están separados unos de otros por pequeños tabiques lo que permite ensayar en cada pocillo una disolución problema (*Figura 2.2*).

La pieza superior presenta tres orificios laterales por pocillo, distribuidos dos en un lateral, por los que se introduce la disolución problema y la del manitol, y el tercero, en el lateral opuesto que permite la entrada de oxígeno al pocillo.

La pieza inferior constituye la base de los pocillos y posee una serie de elementos punzantes que permiten la fijación del intestino.

Como anteriormente se ha mencionado, antes de comenzar el ensayo de absorción las placas deben atemperarse en el interior de la cámara a 37 °C durante 30 minutos. Pasado este periodo, las placas se conectan al sistema de oxigenación y se colocan unos tapones en los dos orificios laterales con el fin de mantener la solución nutritiva en el pocillo.

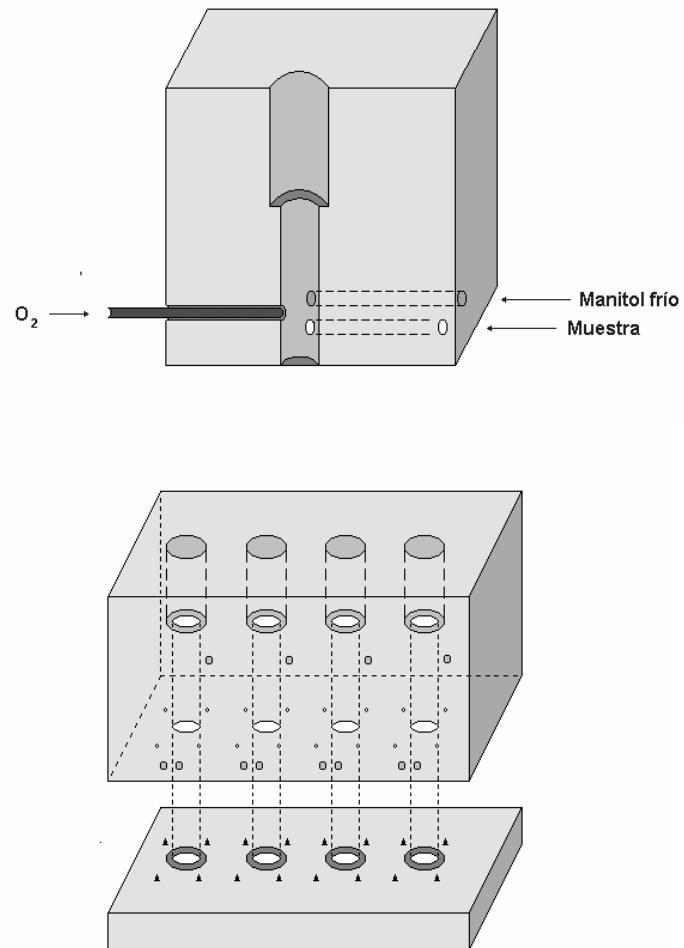


Figura 2.2: Esquema de la situación de los pocillos y orificios en las placas de metacrilato utilizados para el ensayo de absorción.

2.3.3 Descripción del proceso completo

Los animales de experimentación se anestesian con éter dietílico. La rata se introduce en un embudo de cristal por cuya boquilla se vierte una pequeña cantidad de anestésico. Cuando la rata está anestesiada, se traslada rápidamente a la mesa quirúrgica y, tras colocarla en posición decúbito supino, se procede a la extirpación del intestino mediante una laparotomía.

Una vez abierta la cavidad abdominal, se localiza el estómago y se realiza un corte a nivel del píloro, donde comienza el intestino delgado y tirando suavemente se extirpa todo el intestino delgado hasta alcanzar el ciego, donde se efectúa un nuevo corte. Una vez extirpado el intestino completo se dobla por la mitad y, se selecciona el tramo medio intestinal correspondiente, aproximadamente, a los 30 cm intermedios del intestino delgado de la rata, obteniéndose dos segmentos de unos 15 cm cada uno. Por último se sacrifica la rata, incruentamente, con un exceso de anestesia.

El tramo intestinal se secciona longitudinalmente sobre la línea media y se lava en un baño frío de disolución nutritiva. Cuando está limpio se fija, con la mucosa hacia arriba, sobre la pieza inferior de la placa de ensayo, en la cual se ha colocado previamente papel de filtro impregnado de disolución nutritiva. A continuación se lleva a la cámara, se sitúa bajo la pieza superior de la placa y se atornilla suavemente; después se llenan los pocillos con disolución nutritiva, se colocan los tapones superiores y se procede a atornillar definitivamente la placa (placa nº 1). Tanto el proceso de fijación del intestino sobre la placa, como el montaje final de las placas ha de realizarse en el mínimo tiempo posible ya que durante estas operaciones el intestino permanece sin oxigenación y sin aporte nutritivo. Así mismo hay que evitar, en lo posible, dañar la mucosa intestinal durante la manipulación. Este mismo proceso se lleva a cabo con el segundo tramo de intestino aislado (placa nº 2).

Una vez las placas están perfectamente montadas y se encuentran en el interior de la cámara, debe someterse al intestino a un periodo de incubación (aproximadamente 10 minutos) con solución nutritiva, tiempo durante el cual se regenera el tejido intestinal.

Transcurrido este periodo de incubación, se inicia el ensayo de absorción utilizando las disoluciones con el fármaco a ensayar. La manera de proceder es la siguiente, tanto para la primera como para la segunda placa:

- Se retiran el tapón superior y los laterales para vaciar los pocillos, secándose cuidadosamente la superficie de la mucosa expuesta con un papel suave.
- Se introducen en los orificios laterales las jeringas que contienen el manitol frío y la disolución de acamprosato a ensayar.
- Se inyecta la disolución de acamprosato y simultáneamente se pone en marcha el cronómetro. Se mantiene la disolución en contacto con la mucosa aproximadamente 30 segundos. Transcurrido este tiempo, se recupera la disolución problema y se inyecta manitol frío, que detiene inmediatamente el transporte por enfriamiento súbito del tejido y por dilución de la disolución de perfusión remanente en el interior del pocillo. En este preciso instante se detiene el cronómetro y se anota el tiempo exacto que ha permanecido la disolución problema en contacto con la mucosa.
- Rápidamente se secciona con un sacabocados la superficie de mucosa expuesta, se introduce en un baño de manitol frío y se seca suavemente antes de introducirla en un tubo de ensayo con 2 mL de ácido nítrico 0.1 N.
- La disolución problema recogida se vierte a otro tubo de ensayo.

Este mismo proceso se repite para cada uno de los pocillos de las dos placas. De esta forma se obtienen ocho muestras por cada animal ensayado.

De acuerdo con lo expuesto se deduce que, de cada disolución ensayada, o de cada pocillo se obtienen dos tipos de muestras:

- *Tejido intestinal*: se introduce en un tubo de ensayo con 1 mL de ácido nítrico y se lleva a agitación durante 16-18 h. Con esta operación se extrae del interior del enterocito el fármaco absorbido o transportado y, de la superficie de la mucosa, el fármaco no absorbido y el ^3H -PEG-4000 que “contamina” dicha superficie. Esta muestra se denomina “m”.

- *Disolución problema*: se vierte en un tubo de ensayo y se guarda en la cámara fría (4 °C) hasta su valoración analítica. Esta muestra se denomina “i”.

2.4 TÉCNICA ANALÍTICA

Para la cuantificación del acamprosato presente en las muestras obtenidas en el ensayo de absorción se ha utilizado la medida de la radiactividad mediante un contador de centelleo en fase líquida. Se trata de una técnica muy sensible para el conteo de emisiones tipo β .

2.4.1 Fundamento de la técnica: conteo de centelleo en fase líquida

Es una de las técnicas más adecuadas para la detección y cuantificación de la radiactividad tipo β , que es la misma que origina el núcleo de un isótopo radiactivo como ^3H ó ^{14}C . Las partículas β disipan su energía cinética, mediante colisiones, en el medio en el que son liberadas,

y este medio no es otro que el *líquido de centelleo*. Este líquido permite transformar la energía cinética de las partículas β en fotones emitidos.

La detección de fotones se lleva a cabo mediante un tubo fotomultiplicador, que consiste en un dispositivo fotosensible el cual amplifica los fotones detectados y los transforma en un impulso eléctrico. Finalmente los impulsos generados se traducen en cuentas por minuto (c.p.m.) gracias a un sistema de registro adecuado.

2.4.2 Actividad radiactiva. Unidades de medida

La actividad de un radionúclido se define como su velocidad de desintegración, es decir, el número de transformaciones nucleares o desintegraciones que se producen por unidad de tiempo y se expresa mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 2.1
$$A = \frac{dN}{dt}$$

siendo **A** la actividad de un radionúclido y **dN** el número de átomos que se desintegran en un corto intervalo de tiempo, **dt**.

En el Sistema Internacional, se utiliza como medida de la actividad radiactiva el bequerelio (Bq) que equivale a una desintegración por segundo (d.p.s.). Sin embargo, por razones históricas se sigue utilizando el Curio (Ci) como unidad de actividad. El curio se define como la actividad de una sustancia en la que se desintegran $3.7 \cdot 10^{10}$ núcleos por segundo. La equivalencia entre curio y bequerelio es:

$$1 \text{ Ci} = 3.7 \cdot 10^{10} \text{ Bq (d.p.s.)}$$

2.4.3 Eficiencia e interferencias en el conteo

2.4.3.1 Eficiencia

La actividad real de la muestra puede expresarse en *desintegraciones por minuto* (d.p.m.), pero debido a que el sistema detector evalúa los fenómenos de centelleo producidos como consecuencia de las desintegraciones y no las propias desintegraciones, estos centelleos se traducen en impulsos eléctricos que son medidos como *cuentas por minuto* (c.p.m.). A la relación existente entre c.p.m. y d.p.m. se conoce con el nombre de *eficiencia o rendimiento*, (E):

Ecuación 2.2

$$E = \frac{\text{c.p.m.}}{\text{d.p.m.}}$$

Es decir, la eficiencia de una medida de actividad radiactiva es la relación entre la tasa de cuentas colectadas (c.p.m.) y la actividad real de la muestra (d.p.m.), por lo que a mayor eficiencia en la detección, más se aproximará el valor de c.p.m. de la muestra de material radiactivo a la actividad real de la misma (d.p.m.).

Entre los factores que hacen que la eficiencia sea inferior a la unidad se encuentran el fenómeno de extinción, la eficacia de los instrumentos de medida y la homogeneidad de la muestra entre otros. Así pues, al realizar medidas de muestras radiactivas es necesario conocer la eficiencia de detección del equipo. Es más, cuando se trabaja con muestras doblemente marcadas, deben determinarse las eficiencias para cada uno de los radionúclidos presentes en la muestra (en este caso, eficiencias de detección para el ^3H y para el ^{14}C). Dichas eficiencias se determinan preparando patrones de ^3H y ^{14}C en los cuales la actividad (d.p.m.) es perfectamente conocida y, a partir de los mismos, se calcula la actividad real del ^3H y del ^{14}C en las muestras problema.

2.4.3.2 Interferencias en el contaje

Las interferencias más importantes, por cuanto que pueden influir más en el presente estudio y que conviene tener en cuenta, son las siguientes:

- El *ruido de fondo*: se debe a la existencia de una serie de impulsos eléctricos registrados que no son producidos por la actividad radiactiva de la muestra. Este ruido se puede reducir instalando tubos fotomultiplicadores y circuitos electrónicos de coincidencia que computan sólo las señales generadas simultáneamente. Además es conveniente preparar controles negativos o blancos (sin producto radiactivo pero con composición idéntica al resto de las muestras) con el fin de cuantificar esta posible interferencia.
- Proporción entre *muestra y líquido de centelleo*: En la valoración de muestras acuosas es necesario que las proporciones entre el líquido de centelleo (fase orgánica) y la muestra (fase acuosa) sean adecuadas y constantes en todas las muestras para que la formación de la emulsión o coloide correspondiente sea *estable y homogénea* a todas ellas.
- La *extinción*: consiste en una atenuación parcial de los centelleos producidos en el líquido de centelleo. Debido a que este fenómeno depende de la composición química de las muestras, los viales a valorar se preparan de forma que todos tengan la misma composición química, así el grado de extinción y, por tanto, la eficiencia del contaje es la misma en todas las muestras. Es esencial conocer la eficiencia del contaje en cada muestra, por comparación con patrones, para poder determinar la actividad real de las mismas.

2.4.4 Equipo de valoración utilizado

Para la valoración de las muestras se ha utilizado un contador de centelleo en fase líquida modelo RACKBETA 1219 de LKB WALLAC®. El contador está conectado a un ordenador personal PC Olivetti 386, desde el cual se programa y selecciona la información que se desea obtener.

2.4.5 Contaje simultáneo de ^3H y ^{14}C

Las partículas β emitidas por un radionúclido producen un espectro de energía continuo (Espectro de E^a_β) desde 0 keV al valor de E^a máxima típica de cada radionúclido.

ENERGÍAS DEL ESPECTRO DE E^a_β (keV)		
<i>Isótopos</i>	<i>E° mínima</i>	<i>E° máxima</i>
^3H	0	18.6
^{14}C	0	156

Como se observa en la *Figura 2.3*, los espectros de E^a_β de los isótopos ^3H y ^{14}C se superponen.

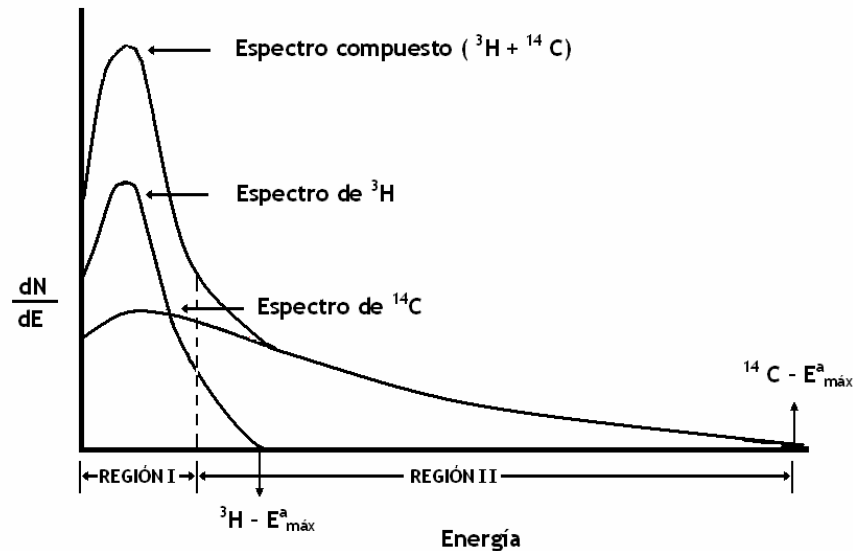


Figura 2.3: Representación de los espectros de E_{β}^a para el ^3H y el ^{14}C y del espectro resultante de la superposición de ambos. Se muestra también las regiones seleccionadas para la cuantificación de ^3H (región I) y ^{14}C (región II). $^3\text{H}-E_{\text{max}}^a$: la energía máxima típica para el tritio es 18,6 keV. $^{14}\text{C}-E_{\text{max}}^a$: la energía máxima para el isótopo ^{14}C es 156 keV.

La cuantificación de la radiactividad de la muestra debida a cada isótopo se basa en el reconocimiento del espectro de E_{β}^a para cada uno de ellos. Con este fin se seleccionan dos regiones de energía (una para cada isótopo) y se cuantifican por separado los impulsos eléctricos que se producen en cada una de las regiones seleccionadas.

Debido a que los espectros energéticos se superponen, la selección de dichas regiones de energía se realiza de modo que se reduzca al máximo la contribución del isótopo ^{14}C a las c.p.m. colectadas en la región I (región seleccionada para la cuantificación de ^3H) así como la contribución del ^3H a las c.p.m. colectadas en la región II (región seleccionada para la

cuantificación de ^{14}C). Estas contribuciones se pueden reducir pero nunca eliminar del todo, al menos con el sistema operador que posee el contador de centelleo utilizado. Por ello, las c.p.m. colectadas en cada región se corrigen por transformación en d.p.m. para obtener la actividad radiactiva que corresponde a cada isótopo presente en la muestra a valorar, teniendo en cuenta la contribución de cada isótopo en la región seleccionada.

2.4.6 Puesta a punto del método de valoración

La puesta a punto del método de valoración se ha realizado mediante el cálculo de las eficiencias de conteo para cada isótopo (^3H y ^{14}C) en la muestra a valorar en cada una de las regiones de energía seleccionadas, I y II. Dichas eficiencias se determinan mediante la valoración de patrones de ^3H y ^{14}C de actividad perfectamente conocida (d.p.m.) y que han sido suministrados por WALLAC®. Las condiciones de valoración de los patrones han sido las mismas que las utilizadas para valorar las muestras problema. También es necesario, como se ha comentado anteriormente, la preparación de controles negativos o “blanco” con el fin de cuantificar y corregir adecuadamente el ruido de fondo del contador. Éstos se preparan de manera que su composición química es exactamente igual que la de las muestras problema pero no contienen ningún isótopo radiactivo. Obviamente la actividad que cuantifica el aparato en estos “blancos” es debida al ruido de fondo. Habitualmente se preparan dos blancos en cada ensayo.

Las eficiencias de conteo son necesarias para la posterior corrección y transformación de las c.p.m., colectadas en cada región, en actividad radiactiva: d.p.m. del ^3H y d.p.m. del ^{14}C . El cálculo de las d.p.m. se realiza como se indica a continuación:

$$\text{Ecuación 2.3} \quad ({}^3\text{H dpm}) = \frac{E_4 \cdot (\text{cpm I} - b_1) - E_2 \cdot (\text{cpm II} - b_2)}{E_1 \cdot E_4 - E_3 \cdot E_2}$$

$$\text{Ecuación 2.4} \quad ({}^{14}\text{C dpm}) = \frac{E_1 \cdot (\text{cpm II} - b_2) - E_3 \cdot (\text{cpm I} - b_1)}{E_1 \cdot E_4 - E_3 \cdot E_2}$$

expresiones en las que E_1 y E_3 representan la eficiencia de conteo del isótopo ${}^3\text{H}$ en la región I y II respectivamente, y del mismo modo, E_2 y E_4 la eficiencia de conteo del isótopo ${}^{14}\text{C}$ en la región I y II respectivamente; **cpm I** y **cpm II** son las c.p.m. colectadas en la región I y II para la muestra problema, y b_1 y b_2 son las c.p.m. colectadas en la región I y II para la muestra que hemos denominado como "blanco".

Para evitar cualquier alteración del valor de las c.p.m. como consecuencia de fluctuaciones de la tensión eléctrica, se ha realizado para cada muestra tres medidas repetidas de la radiactividad. La duración de cada uno de los conteos ha sido de 10 minutos y se ha utilizado la media de éstos para el cálculo del flujo de acamprosato a través del borde en cepillo de los enterocitos.

2.4.7 Preparación de las muestras a valorar

Tras el ensayo de absorción se obtienen dos tipos de muestras para cada disolución de acamprosato perfundida: extracto nítrico de la mucosa expuesta al fármaco (muestras "m"), y fluido de incubación recuperado (muestras "l"). Estas muestras se preparan previamente a su cuantificación de manera que la composición química en ellas sea similar. La composición de estas muestras, así como de los blancos y patrones (de ${}^3\text{H}$, de ${}^{14}\text{C}$ y de una mezcla de ambos isótopos) para su valoración se detalla en el *Cuadro 2.3*.

PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS PARA LA VALORACIÓN				
Muestras de valoración	Composición			
	<i>Muestra radiactiva</i>	<i>Disolución nutritiva</i>	<i>Ác. Nítrico 0.1 N</i>	<i>Líquido de centelleo</i>
<i>Vial m</i>	500 µL de <i>muestra m</i>	50 µL		3 mL
<i>Vial i</i>	50 µL de <i>muestra i</i>	---	500 µL	3 mL
<i>Blanco</i>	---	50 µL	500 µL	3 mL
<i>Patrón ^3H</i>	<i>a</i>	---	500 µL	3 mL
<i>Patrón ^{14}C</i>	<i>b</i>	---	500 µL	3 mL
<i>Patrón ^3H y ^{14}C</i>	<i>c</i>	---	500 µL	3 mL

Cuadro 2.3: Protocolo de preparación de las muestras obtenidas tras el ensayo, blancos y patrones para su valoración por Centelleo en fase Líquida, en viales de plástico adecuados. Los viales una vez preparados deben agitarse para conseguir una mezcla íntima y homogénea entre el producto radiactivo y el líquido de centelleo.

- *Muestra m*: extracto nítrico de la mucosa expuesta.
- *Muestra i*: fluido de incubación recuperado.
- *a*. Cápsula patrón de ^3H WALLAC® (200200 d.p.m.)
- *b*. Cápsula patrón de ^{14}C WALLAC® (101600 d.p.m.)
- *c*. Cápsulas patrón de ^3H y ^{14}C WALLAC®.

2.5 MÉTODOS MATEMÁTICOS

2.5.1 Consideraciones previas

El flujo de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos, se calcula una vez se conoce la actividad correspondiente a cada isótopo, ^3H y ^{14}C , para cada una de las muestras de valoración, *vial m* y *vial i*.

La cantidad inicial de compuestos radiactivos ^3H -PEG-4000 (P_o) y ^{14}C -acamprosato (F_o), adicionada a todas las disoluciones de acamprosato ensayadas es constante. Durante el tiempo que dura el ensayo, el acamprosato se transporta al interior del enterocito, siendo F_i la actividad, en d.p.m., de ^{14}C -acamprosato transportada al interior del enterocito y F_a la actividad, en d.p.m., de ^{14}C -acamprosato no absorbida pero presente en el líquido de disolución adherido a la mucosa. Evidentemente, estas dos actividades no pueden distinguirse por medida directa; por ello se utiliza un compuesto de gran tamaño molecular (PEG-4000), que no atraviesa la membrana y que está marcado con un isótopo distinto, ^3H . Además la disolución utilizada para el ensayo de absorción contiene también acamprosato no marcada a distintas concentraciones, C . Los procesos que tienen lugar durante la realización del ensayo de difusión *in vitro*, se describen esquemáticamente en la *Figura 2.5*.

Tras la valoración de las muestras se obtienen cuatro datos de actividad, cuya significación y manejo se describen en los epígrafes siguientes:

- P_o : Actividad total en d.p.m. del ^3H -PEG-4000 (*muestra "i"*).
- P_a : Actividad en d.p.m. del ^3H -PEG-4000 presente en la superficie de la mucosa (*muestra "m"*).
- F_o : Actividad total en d.p.m. de ^{14}C -Acamprosato (*muestra "i"*).

- F_m : Actividad en d.p.m. de ^{14}C -Acamprosato presente en el tejido intestinal (adherida o no transportada (F_a) más la transportada (F_t) al interior del enterocito) (*muestra "m"*).

2.5.2 Fármaco adherido a la membrana del enterocito y no transportado

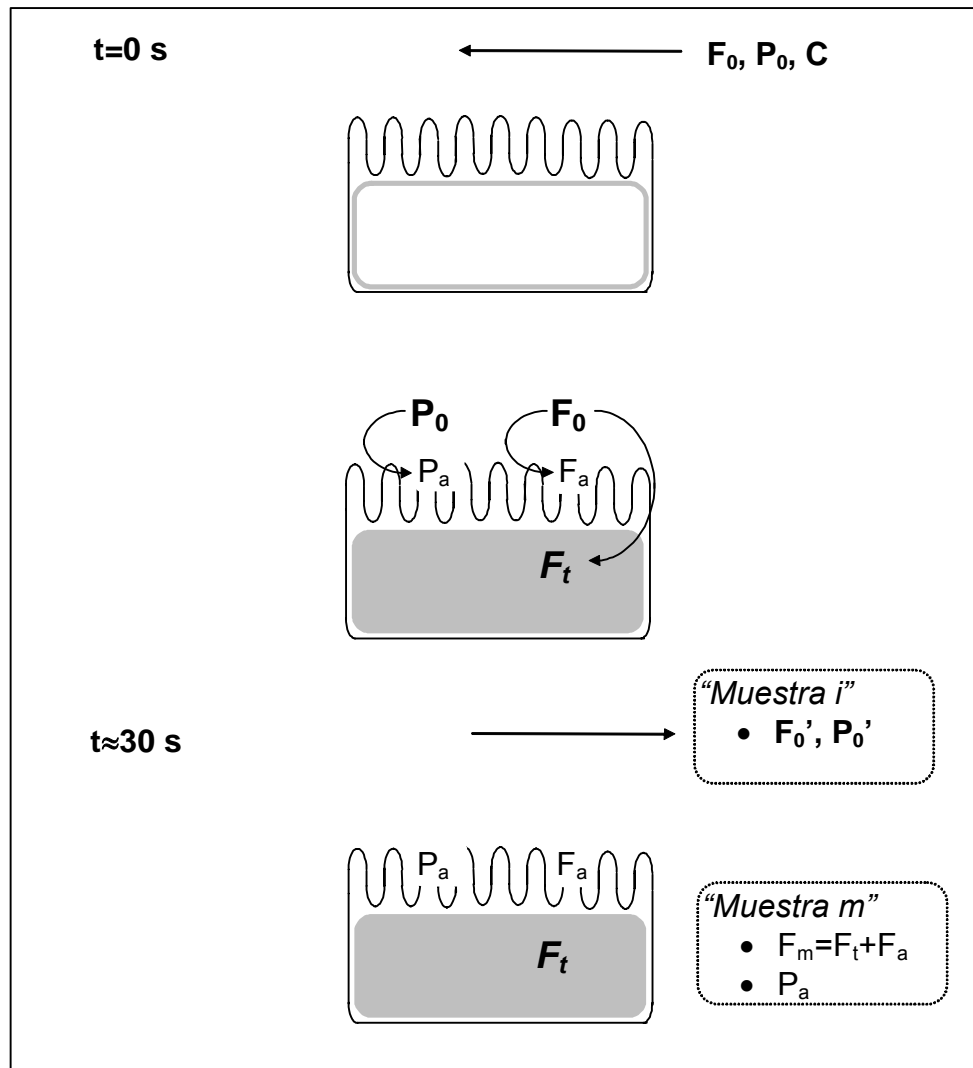
El compuesto radiactivo ^3H -PEG-4000, no absorbible, se ha usado con el fin de evaluar la cantidad de fármaco no transportado que "contamina" extracelularmente la superficie de la mucosa expuesta a la disolución de ensayo y que por tanto se cuantifica en el extracto nítrico. De esta manera se pueden realizar las correcciones oportunas.

La actividad radiactiva, en d.p.m., de ^3H -PEG-4000 presente en la membrana del enterocito (P_a) es representativa de la actividad en d.p.m. de ^{14}C -acamprosato presente en el tejido intestinal, adherida o no absorbida, (F_a) por lo que se ha calculado mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 2.5

$$F_a = F_0 \cdot \frac{P_a}{P_0}$$

expresión en la que los distintos términos se han descrito previamente.



Valoración

$Q_t \Leftarrow$ Vial m (1 mL muestra m)

- P_a
- $F_m = F_a + F_t$

Vial i (50 μ L muestra i)

- $P_0' = P_0 - P_a; P_a \ll P_0 \Rightarrow P_0' = P_0$
- $F_0' = F_0 - F_m; F_m \ll F_0 \Rightarrow F_0' = F_0$

$\Rightarrow Q_i$

Figura 2.5: Esquema de los procesos que prevalecen durante la realización del ensayo de absorción.

2.5.3 Fármaco transportado o absorbido.

La actividad radiactiva correspondiente al fármaco transportado o absorbido (F_t) se ha calculado por diferencia entre la actividad radiactiva de ^{14}C -acamprosato presente en el tejido intestinal (adherida más transportada, F_m) y la actividad de ^{14}C -acamprosato no transportada pero presente en la membrana (F_a), es decir:

Ecuación 2.6
$$F_t = F_m - F_a$$

Sustituyendo, en la *Ecuación 2.6*, F_a por su valor según la *Ecuación 2.5*, se obtiene:

Ecuación 2.7
$$F_t = F_m - F_0 \cdot \frac{P_a}{P_0}$$

expresión en la que todos los términos son conocidos tras la valoración de las muestras.

2.5.4 Conversión de la actividad en cantidad de acamprosato absorbida

El valor de actividad F_t depende de la concentración de acamprosato en la disolución de perfusión. F_0 es la actividad ^{14}C -acamprosato total obtenida tras la valoración de 50 μL de fluido de incubación recuperado. Dicho fluido también contiene una cantidad de fármaco Q_i que es función de la concentración de la disolución de acamprosato, es decir:

Ecuación 2.8
$$Q_i = 50 \cdot 10^{-6} \cdot C$$

siendo **C** la concentración, en mM, de acamprosato en la disolución de perfusión utilizada y **Q_i** la cantidad de acamprosato existente en 50 µL de fluido de incubación recuperado (*vial i*), expresada en milimoles.

Por lo tanto, puede establecerse una relación entre cantidad de fármaco no marcado y actividad radiactiva del fármaco marcado que permite el cálculo de la cantidad total de acamprosato transportada al interior del enterocito (**Q_t**) a partir del valor de actividad **F_t**:

Ecuación 2.9
$$Q_t = Q_i \cdot 2 \cdot \frac{F_t}{F_0}$$

El valor de **F_t** se multiplica por dos para obtener **Q_t**, porque **F_t** procede de la valoración de sólo 500 µL de extracto nítrico de la mucosa intestinal expuesta, cuando el volumen total de dicho extracto es de 1 mL.

Sustituyendo en la *Ecuación 2.9*, **F_t** por su valor de acuerdo con la *Ecuación 2.7*, y **Q_i** por su valor en la *Ecuación 2.8*, se obtiene para **Q_t** la expresión:

Ecuación 2.10
$$Q_t = 2 \cdot 50 \cdot 10^{-6} \cdot C \cdot \left(\frac{F_m}{F_0} - \frac{P_a}{P_0} \right)$$

en la que todos los valores se conocen o se han calculado previamente.

2.5.5 Flujo de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos

El flujo de acamprosato (ϕ) a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos se define como la cantidad de acamprosato transportada o absorbida por unidad de tiempo y superficie:

Ecuación 2.11
$$\phi = \frac{Q_t}{S \cdot t}$$

expresión en la que **S** representa la superficie de mucosa, de 0.35 cm^2 , expuesta al fármaco, **t** el tiempo de ensayo, expresado en segundos, durante el cual se ha transportado una cantidad, **Q_t** , de fármaco al interior del enterocito. Sustituyendo **Q_t** por su valor en la *Ecuación 2.10*, se obtiene:

Ecuación 2.12
$$\phi = \frac{2 \cdot 50 \cdot 10^{-6} \cdot C}{0.35 \cdot t} \cdot \left(\frac{F_m}{F_0} - \frac{P_a}{P_0} \right)$$

Realizando los cálculos oportunos se obtiene la siguiente ecuación del flujo de fármaco, expresado en $\mu\text{mol} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$:

Ecuación 2.13
$$\phi = \frac{360 \cdot C}{0.35 \cdot t} \cdot \left(\frac{F_m}{F_0} - \frac{P_a}{P_0} \right) \longrightarrow \frac{\mu\text{mol}}{\text{cm}^2 \cdot \text{h}}$$

en la que **C** es la concentración mM de acamprosato en la disolución de perfusión, **t** es el tiempo en segundos durante el cual se transporta el fármaco a través del borde en cepillo y **F_m** , **F_0** , **P_a** , **P_0** son los valores de actividad radiactiva obtenidos tras la valoración de las muestras.

2.5.6 Determinación de la constante de absorción k_a

Según lo descrito en el *epígrafe 1.1.1* la cinética de absorción por difusión pasiva es de orden uno y se rige por la siguiente expresión, derivada de la Ley de Fick:

Ecuación 2.14
$$\phi = k_a \cdot A$$

en la que ϕ es el flujo del fármaco a través de la membrana de los microvilli, A la concentración de fármaco en el lumen intestinal y k_a la **constante de velocidad por difusión pasiva**, parámetro constante para un mismo fármaco e idénticas condiciones experimentales

De acuerdo con la *Ecuación 2.14*, por regresión lineal de los valores de flujo de acamprosato frente a las distintas concentraciones del fármaco ensayadas, es posible determinar el valor de k_a expresada en cm/h.

2.6 MÉTODOS ESTADÍSTICOS

2.6.1 Cálculo y análisis estadístico de la k_a del acamprosato

Para el cálculo de la constante de velocidad de absorción del acamprosato se ha realizado la regresión lineal, por mínimos cuadrados, de los valores de flujo de acamprosato obtenidos frente a las distintas concentraciones ensayadas para cada condición (grupo *Crónico*, *Control* y

Sólido) (SIGMAPLOT® 4.0). El ajuste se ha realizado a un modelo de regresión lineal:

$$y = a + b \cdot x$$

Con el objetivo de detectar diferencias entre los valores de k_a de los distintos grupos se realizó un ANOVA de comparación de pendientes.

2.6.2 Influencia de distintos aminoácidos en la velocidad de absorción del acamprosato

Con el fin de comprobar la existencia de inhibición del flujo del acamprosato en presencia de distintos inhibidores para cada condición de experimentación (grupo *Crónico* y *Control*) se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA). Esta prueba se llevó a cabo con el paquete estadístico STATGRAPHICS v7.0.

Cuando el ANOVA realizado en los ensayos de inhibición detectó diferencias estadísticamente significativas, se realizó como complemento, una prueba de comparación de las medias de tratamiento (flujo de acamprosato obtenido a una concentración determinada en presencia de distintos aminoácidos) con una media control (flujo de acamprosato obtenido a la misma concentración determinada sin inhibidor), denominado Método de Dunnet. Esta prueba identifica qué condición experimental, es decir, qué inhibidor modifica estadísticamente el valor medio del flujo del acamprosato a una concentración determinada en un grupo de experimentación determinado (grupo *Control* y *Crónico*). El valor del estadístico que se calcula es D_u :

$$D_u = d_{(k,G;\alpha)} \sqrt{\frac{\text{error media cuadrática}}{n}}$$

donde **d** es el valor crítico para **k** grupos (tratamientos + control), **G** grados de libertad del error de la media cuadrática igual a N-k y el nivel de significación $\alpha=0.05$.

2.6.3 Influencia del sodio en la velocidad de absorción del acamprosato

La comparación de las medias de los flujos de acamprosato a la concentración de 100 μM obtenido en presencia y en ausencia de Na^+ se realizó mediante la prueba t de Student ($\alpha=0.05$).

Capítulo 3: RESULTADOS

3.1 FLUJO DE ACAMPROSATO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA DE LOS MICROVILLI

Una vez determinada la radiactividad de las muestras obtenidas tras el ensayo de absorción *in vitro* y después de realizar los cálculos matemáticos oportunos, se obtienen los valores de flujo (ϕ) de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos (borde en cepillo o “brush border” en la terminología anglosajona) para cada uno de los grupos de experimentación.

En los *Cuadros 3.1* a *3.3* se detallan los valores individuales de flujo de acamprosato para cada concentración de fármaco ensayada y para cada una de las condiciones de ensayo. En el *Cuadro 3.4* se muestran los valores medios de flujo ($n \geq 6$), su desviación estándar y su coeficiente de

variación. Estos valores han sido utilizados para realizar los ajustados matemáticos.

En la *Gráfica 3.1* se representa, mediante un diagrama de barras, los flujos medios de acamprosato obtenidos a cada concentración de fármaco ensayada en cada grupo experimental, así como sus desviaciones estándar.

GRUPO CONTROL												
Flujo de Acamprosato a través de la membrana de los microvilli (nmol/cm ² ·h)												
Concentración de Acamprosato (μM)												
10	25	100	600	2500	5000	10000	15000	25000	40000	80000		
2.81	21.40	97.50	214.20	413.65	2232.59	1781.85	2693.46	6717.41	6697.30	21788.13		
2.72	21.22	100.92	199.09	485.64	1201.81	2221.11	2701.54	5200.55	9525.17	15978.69		
2.07	21.76	106.97	260.04	412.48	1246.78	2327.82	3063.71	7547.99	9607.36	12863.03		
2.14	23.49	115.84	146.36	455.66	1448.48	2050.60	2149.78	5179.38	9051.87	14719.15		
2.05	20.19	117.88	179.11	514.32	1141.54	3176.96	3326.84	5097.68	6579.61	19953.01		
1.89	16.41	137.58	167.35	476.89	1152.52	1953.50	3070.46	3680.81	6974.95	18358.01		
2.12	16.57	124.07	183.45	499.35		2232.59	2191.52		6888.79			
	25.05	145.10										

Cuadro 3.1: Valores individuales de flujo de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos a las diferentes concentraciones de fármaco ensayadas en los animales de experimentación del grupo CONTROL.

GRUPO CRÓNICO											
Flujo de Acamprosato a través de la membrana de los microvilli (nmol/cm ² ·h)											
Concentración de Acamprosato (μM)											
10	100	1000	2500	5000	10000	15000	25000	40000	80000		
2.00	16.51	148.27	469.76	596.30	2562.63	2320.53	4248.78	6722.47	19067.05		
1.75	10.99	174.67	370.67	950.88	1523.85	2688.37	3351.13	8854.66	20620.64		
1.76	10.43	190.22	542.47	734.77	1391.19	3176.36	3008.79	8697.03	14385.24		
1.32	18.20	183.43	613.03	1092.73	1312.17	3591.00	3059.45	6271.03	17529.24		
2.47	10.44	271.43	446.62	649.59	2552.49	2198.40	3445.00	9046.62	12434.23		
1.43	10.44	241.36	374.68	1014.40	1440.23	3038.63	5162.43	6868.28	15155.98		
	20.10	127.64	448.01	750.73	3088.96	3715.40		6716.01			
		231.27	584.73					10956.81			
								8042.51			

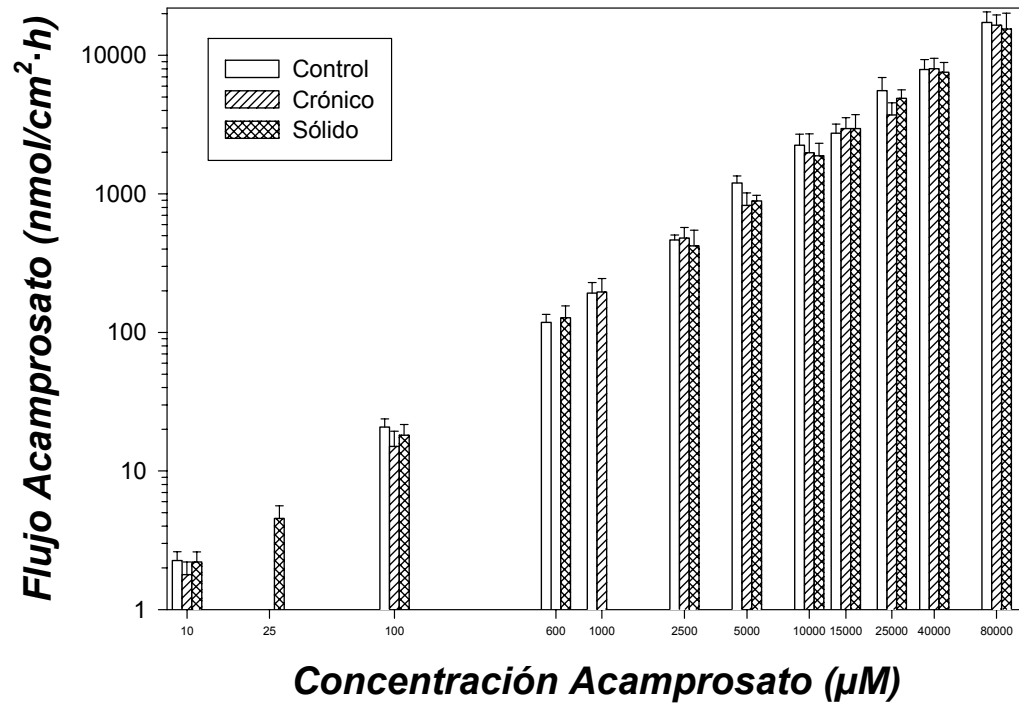
Cuadro 3.2: Valores individuales de flujo de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos a las diferentes concentraciones de fármaco ensayadas en los animales de experimentación del grupo **CRÓNICO**.

GRUPO SÓLIDO											
Flujo de Acamprosato a través de la membrana de los microvilli (nmol/cm ² ·h)											
Concentración de Acamprosato (μM)											
10	25	100	600	2500	5000	10000	15000	25000	40000	80000	
2.61	3.73	15.90	125.20	607.19	850.30	1628.50	2407.29	5835.98	8602.76	10981.31	
1.90	6.08	21.14	143.41	435.15	1001.05	1597.40	2939.19	4585.29	6939.74	17905.64	
1.80	4.24	19.53	104.71	311.53	745.13	1833.18	2004.91	4735.84	8252.62	15686.33	
2.45	3.58	23.29	173.87	458.64	940.81	2901.03	2698.74	4184.01	5951.56	14483.30	
2.42	5.14	12.98	121.35	295.90	934.77	1637.72	3786.81	4816.73	6440.75	10777.19	
1.73		14.28	98.19		870.80	1825.80	3951.18	4067.62	9243.55	23149.32	
2.56		19.98				2021.51		5426.37			
1.74		17.87				1657.35		4382.54			
2.62								6152.56			

Cuadro 3.3: Valores individuales de flujo de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos a las diferentes concentraciones de fármaco ensayadas en los animales de experimentación del grupo **SÓLIDO**.

FLUJOS MEDIOS DE ACAMPROSATO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA (nmol/cm ² ·h)						
Concentración Acamprosato (μM)	CONTROL		CRÓNICO		SÓLIDO	
	φ ± S	CV%	φ ± S	CV%	φ ± S	CV%
80000	17276.67 ± 3358.31	19.44	16532.06 ± 3079.99	18.63	15497.18 ± 4649.54	30.00
40000	7903.58 ± 1411.33	17.86	8019.49 ± 1524.94	19.02	7571.83 ± 1313.40	17.35
25000	5570.64 ± 1364.57	24.50	3712.60 ± 838.30	22.58	4909.66 ± 735.47	14.98
15000	2742.47 ± 449.29	16.38	2961.24 ± 589.42	19.90	2964.69 ± 768.41	25.92
10000	2249.20 ± 449.68	19.99	1981.64 ± 729.05	36.79	1887.81 ± 434.01	22.99
5000	1199.23 ± 146.92	12.25	827.06 ± 191.53	23.16	890.48 ± 89.27	10.02
2500	465.43 ± 40.13	8.62	481.25 ± 90.90	18.89	421.68 ± 126.41	29.98
1000			196.04 ± 48.68	24.83		
600	192.80 ± 36.73	19.05			127.79 ± 27.66	21.64
100	118.23 ± 16.87	14.27	15.07 ± 4.31	28.60	18.12 ± 3.53	19.48
25	20.76 ± 3.03	14.60			4.56 ± 1.05	23.03
10	2.26 ± 0.36	15.93	1.79 ± 0.41	22.91	2.20 ± 0.40	18.18

Cuadro 3.4: Flujos medios de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos a las diferentes concentraciones de fármaco ensayadas en los tres grupos de experimentación: grupos **CONTROL**, **CRÓNICO** y **SÓLIDO**. Se detalla también la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) para cada concentración ensayada en cada grupo.



Gráfica 3.1: Representación comparativa de los flujos medios de acamprosato y de la desviación estándar obtenidas en los grupos de experimentación **CONTROL**, **CRÓNICO** y **SÓLIDO**, a las distintas concentraciones de fármaco ensayadas.

3.2. CINÉTICA DE LA ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO

3.2.1. Regresión lineal.

La constante de velocidad de absorción, k_a (cm/h), para cada grupo experimental se ha obtenido mediante la regresión lineal por mínimos cuadrados de los valores de flujo frente a las concentraciones de acamprosato ensayadas de acuerdo con la *Ecuación 2.14*.

La regresión lineal se ha realizado con la ayuda del programa informático STATGRAPHICS 7.0. El nivel de significación, α , se ha establecido en el 5%. En los *Cuadros 3.5 a 3.7* se exponen los parámetros de regresión y el resultado del análisis de varianza, obtenidos para cada grupo de animales. En todos ellos se puede observar que existe una dependencia lineal entre la concentración de acamprosato y los flujos obtenidos; también se aprecia que la ordenada en el origen no es estadísticamente distinta de cero.

En las *Gráficas 3.2 a 3.4* se representan los valores medios de flujo de acamprosato y las rectas de regresión obtenidas, en cada uno de los grupos experimentales estudiados. En estas gráficas se puede apreciar que la constante de velocidad de absorción del acamprosato, es decir, la pendiente de la recta de regresión (*Cuadros 3.5 a 3.7*) permanece prácticamente constante en los tres grupos de experimentación (Control, Crónico y Sólido).

GRUPO CONTROL					
Análisis de regresión. Modelo lineal.					
<u>Parámetro</u>	<u>Estimación</u>	<u>Error estándar</u>	<u>Nivel probabilidad</u>		
Ordenada en origen	-45.4902	103.8406	0.6717 (NS)		
Pendiente (k_a)	0.2134	0.0036	<0.0001 (S)		
Análisis de varianza.					
<u>Fuente</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Grados de libertad</u>	<u>Media cuadrática</u>	<u>$F_{Snedecor}$</u>	<u>Nivel de probabilidad</u>
Modelo	276056605.6	1	276056605.6	3448.27	<0.0001 (S)
Residual	720509.4	9	80056.6		
Total	276777115.1	10	27677711.5		
r		r^2		Error estándar de la estimación	
0.99870		0.99740		282.9428	

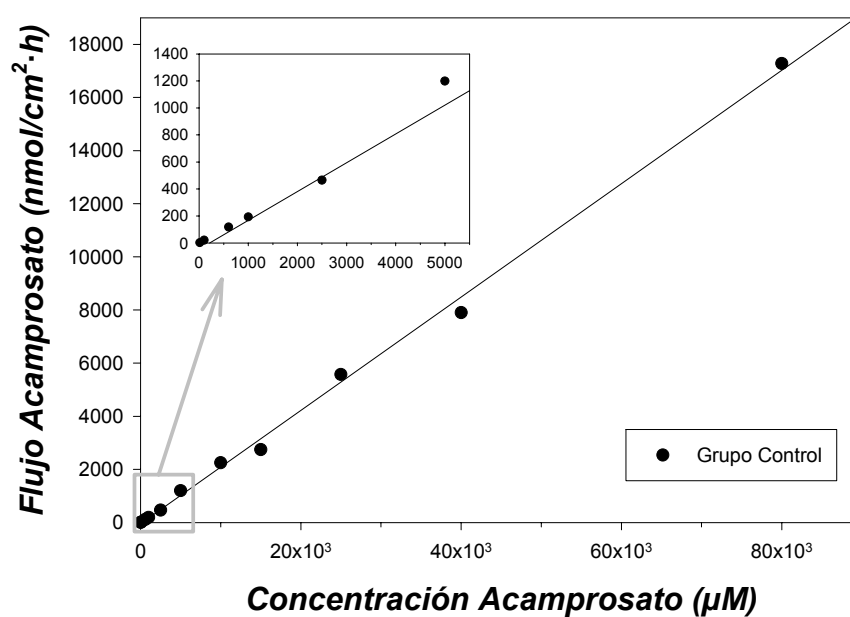
Cuadro 3.5: Parámetros obtenidos tras la regresión lineal y el análisis de varianza para los valores de flujo de acamprosato obtenidos en el grupo de animales **CONTROL**. (NS: no existen diferencias estadísticamente significativas; S: diferencias estadísticamente significativas; r: coeficiente de correlación; r^2 : coeficiente de determinación).

GRUPO CRÓNICO					
Análisis de regresión. Modelo lineal.					
<u>Parámetro</u>	<u>Estimación</u>	<u>Error estándar</u>	<u>Nivel probabilidad</u>		
Ordenada en origen	-183.4996	183.9694	0.3478 (NS)		
Pendiente (k _a)	0.2047	0.0061	<0.0001 (S)		
Análisis de varianza.					
<u>Fuente</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Grados de libertad</u>	<u>Media cuadrática</u>	<u>F_{Snedecor}</u>	<u>Nivel de probabilidad</u>
Modelo	242703912.1	1	242703912.1	1112.11	<0.0001 (S)
Residual	1745896.8	8	218237.1		
Total	244449808.9	9	27161089.8		
r		r ²		Error estándar de la estimación	
0.99642		0.99286		467.1585	

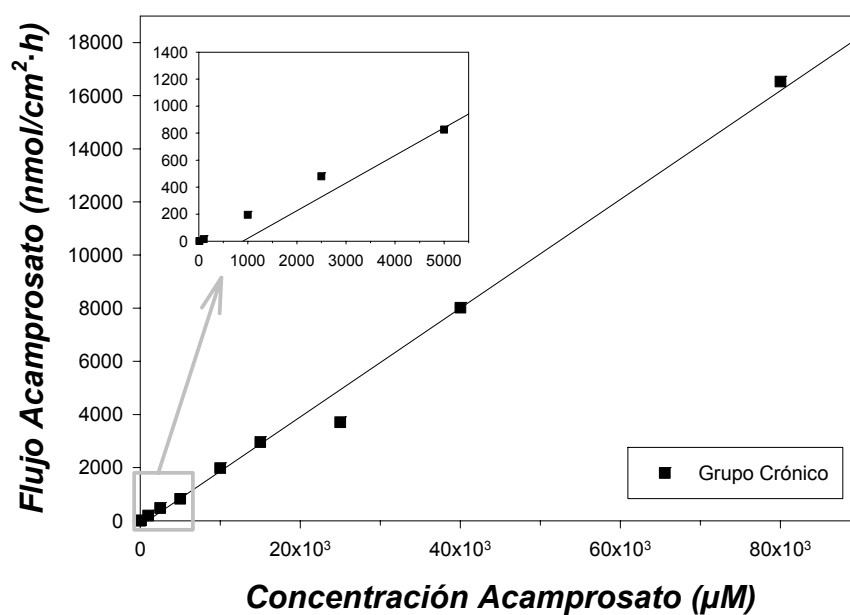
Cuadro 3.6: Parámetros obtenidos tras la regresión lineal y el análisis de varianza para los valores de flujo de acamprosato obtenidos en el grupo de animales **CRÓNICO**. (NS: no existen diferencias estadísticamente significativas; S: diferencias estadísticamente significativas; r: coeficiente de correlación; r^2 : coeficiente de determinación).

GRUPO SÓLIDO					
Análisis de regresión. Modelo lineal.					
Parámetro	Estimación	Error estándar	Nivel probabilidad		
Ordenada en origen	-16.3568	26.2685	0.5489 (NS)		
Pendiente (k _a)	0.1934	0.0009	<0.0001 (S)		
Análisis de varianza.					
Fuente	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media cuadrática	F _{Snedecor}	Nivel de probabilidad
Modelo	227965609.3	1	227965609.3	44269.22	<0.0001 (S)
Residual	46345.7	9	5149.5		
Total	228011955.0	10	22801195.5		
r		r ²		Error estándar de la estimación	
0.99990		0.99980		71.7602	

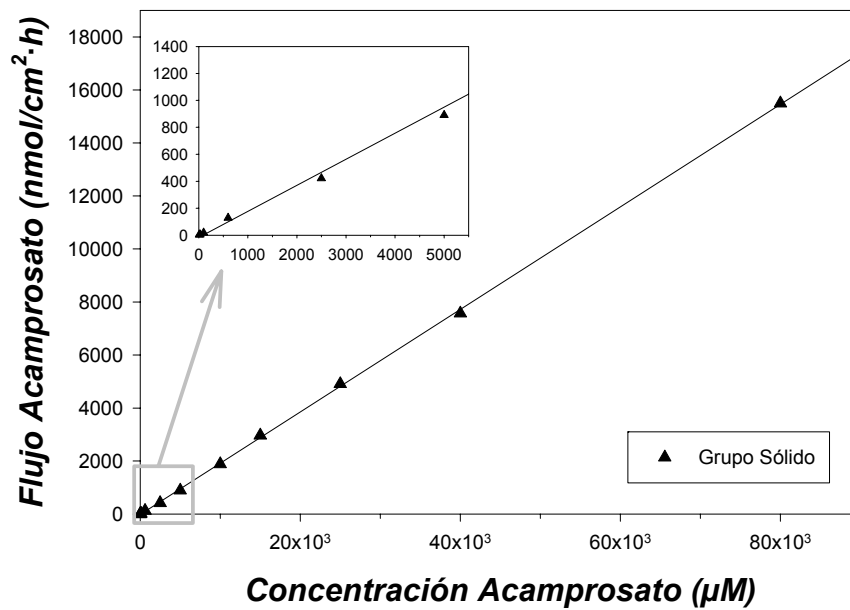
Cuadro 3.7: Parámetros obtenidos tras la regresión lineal y el análisis de varianza para los valores de flujo de acamprosato obtenidos en el grupo de animales **SÓLIDO**. (NS: no existen diferencias estadísticamente significativas; S: diferencias estadísticamente significativas; r : coeficiente de correlación; r^2 : coeficiente de determinación).



Gráfica 3.2: Representación gráfica de los flujos de acamprosato obtenidos a las distintas concentraciones ensayadas del fármaco para el grupo **CONTROL**. Se detalla también la representación correspondiente al resultado de la regresión lineal de los datos experimentales ($r > 0.9987$). Se incluye también una ampliación de los resultados para los valores más bajos de concentración.



Gráfica 3.3: Representación gráfica de los flujos de acamprosato obtenidos a las distintas concentraciones ensayadas del fármaco para el grupo **CRÓNICO**. Se detalla también la representación correspondiente al resultado de la regresión lineal de los datos experimentales ($r > 0.9964$). Se incluye también una ampliación de los resultados para los valores más bajos de concentración.



Gráfica 3.4: Representación gráfica de los flujos de acamprosato obtenidos a las distintas concentraciones ensayadas del fármaco para el grupo **SÓLIDO**. Se detalla también la representación correspondiente al resultado de la regresión lineal de los datos experimentales ($r > 0.9999$). Se incluye también una ampliación de los resultados para los valores más bajos de concentración.

3.2.2 Comparación estadística de las pendientes. Análisis de varianza

El análisis de varianza realizado para la comparación de las pendientes de las regresiones del flujo de acamprosato frente a la concentración, realizadas para cada uno de los grupos estudiados (*Control*, *Crónico* y *Sólido*), indicó que la constante de velocidad de absorción (k_a) de los distintos grupos de experimentación son estadísticamente distintas ($p < 0.05$).

3.3 ENSAYOS DE INHIBICIÓN DEL TRANSPORTE INTESTINAL DEL ACAMPROSATO

Los ensayos de inhibición se han realizado utilizando dos concentraciones distintas de fármaco: 1000 μM y 100 μM , tanto en el grupo *Control* como en el grupo *Crónico*.

A la concentración de 1000 μM se estudió el flujo de acamprosato a través de la membrana de los microvilli en ausencia y en presencia de distintos aminoácidos a la concentración de 40 mM, todos ellos estructuralmente relacionados con el acamprosato: glicina, prolina, GABA y taurina. En los *Cuadros 3.8* y *3.9* se muestran los valores individuales de flujo obtenidos en el grupo *Control* y *Crónico* respectivamente.

A la concentración de 100 μM los estudios de inhibición se realizaron con dos aminoácidos, el GABA y la taurina, a la concentración de 40 mM. En los *Cuadros 3.10* y *3.11* se muestran los valores individuales de flujo obtenidos en ausencia y en presencia de los inhibidores en el grupo *Control* y *Crónico* respectivamente. En el *Cuadro 3.12 (I y II)* se muestran los valores medios con su desviación estándar y su coeficiente de variación obtenidos en los distintos ensayos de inhibición realizados.

Además se han realizado ensayos de inhibición en el grupo control utilizando como inhibidor la taurina a distintas concentraciones: 10, 20 y

80 mM. En este caso la concentración del fármaco ensayada ha sido 100 μM . En el *Cuadro 3.13* se detallan los valores individuales y medios con su correspondiente desviación estándar y coeficiente de variación. También se incluyen en este cuadro los valores de flujo de acamprosato (100 μM) obtenidos en presencia simultánea de GABA (40 mM) y taurina (40 mM).

GRUPO CONTROL				
<i>Flujo de Acamprosato a través de la membrana de los microvilli ($\text{nmol}/\text{cm}^2 \cdot \text{h}$)</i>				
Concentración de Acamprosato: 1000 μM				
Concentración de Inhibidores: 40 mM				
Sin inhibidor	Glicina	Prolina	GABA	Taurina
155.35	151.73	284.99	182.76	181.01
125.05	209.65	159.25	158.26	136.41
151.06	243.66	197.93	181.70	168.23
273.63	183.14	218.45	245.68	221.11
187.19	255.06	146.63	264.26	201.52
187.76			187.44	209.99
231.64			138.56	193.18

Cuadro 3.8: Valores individuales de los flujos de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos obtenidos en el grupo **CONTROL** a la concentración de **1000 μM del fármaco** en ausencia y en presencia de distintos inhibidores (**Glicina**, **Prolina**, **GABA**, **Taurina**) a la concentración de 40 mM.

GRUPO CRÓNICO				
<i>Flujo de Acamprosato a través de la membrana de los microvilli (nmol/cm²·h)</i>				
Concentración de Acamprosato: 1000 µM				
Concentración de Inhibidores: 40 mM				
Sin inhibidor	Glicina	Prolina	GABA	Taurina
142.00	310.28	183.32	183.62	154.30
194.76	286.29	209.30	217.90	188.45
234.55	200.85	296.16	307.47	226.94
157.23	241.86	241.20	163.15	216.53
316.97	286.95	169.03	200.71	311.82
276.36		183.86		173.13
200.55		238.33		206.39
211.076				

Cuadro 3.9: Valores individuales de los flujos de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos obtenidos en el grupo **CRÓNICO** a la concentración de **1000 µM del fármaco** en ausencia y en presencia de distintos inhibidores (**Glicina, Prolina, GABA, Taurina**) a la concentración de 40 mM.

GRUPO CONTROL		
<i>Flujo de Acamprosato a través de la membrana de los microvilli (nmol/cm²·h)</i>		
Concentración de Acamprosato: 100 µM		
Sin inhibidor	Concentración de Inhibidores: 40 mM	
	GABA	Taurina
27.44	21.49	21.27
24.75	24.05	17.07
25.96	21.60	17.07
32.14	31.20	25.80
40.39	25.04	21.53
28.56	31.69	21.53
27.61	21.25	32.22
38.03	14.50	17.02
30.18		16.30
		16.18

Cuadro 3.10: Valores individuales de los flujos de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos obtenidos en el grupo **CONTROL** a la concentración de **100 µM del fármaco** en ausencia y en presencia de distintos inhibidores (**GABA, Taurina**) a la concentración de 40 mM.

GRUPO CRÓNICO		
<i>Flujo de Acamprosato a través de la membrana de los microvilli (nmol/cm²·h)</i>		
Concentración de Acamprosato: 100 µM		
Sin inhibidor	Concentración de Inhibidores: 40 mM	
	GABA	Taurina
24.29	15.73	17.13
30.95	14.28	14.73
22.45	18.84	16.03
40.42	18.81	29.17
45.21	27.45	29.21
37.60		24.69
24.29		

Cuadro 3.11: Valores individuales de los flujos de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos obtenidos en el grupo **CRÓNICO** a la concentración de **100 µM del fármaco** en ausencia y en presencia de distintos inhibidores (**GABA**, **Taurina**) a la concentración de 40 mM.

FLUJOS MEDIOS DE ACAMPROSATO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA (I)				
Concentración de Acamprosato: 1000 μM				
Inhibidor ensayado (40 mM)	CONTROL		CRÓNICO	
	$\phi \pm S$	CV (%)	$\phi \pm S$	CV (%)
Sin Inhibidor	187.38 \pm 51.04	27.20	216.69 \pm 58.34	26.92
Glicina	208.65 \pm 42.64	20.44	265.25 \pm 43.69	16.47
Prolina	201.45 \pm 54.92	27.26	217.31 \pm 44.53	20.49
GABA	194.10 \pm 45.24	23.30	214.57 \pm 55.76	25.99
Taurina	187.35 \pm 28.54	15.23	211.08 \pm 51.04	24.18

FLUJOS MEDIOS DE ACAMPROSATO A TRAVÉS DE LA MEMBRANA (II)				
Concentración de Acamprosato: 100 μM				
Inhibidor ensayado (40 mM)	CONTROL		CRÓNICO	
	$\phi \pm S$	CV (%)	$\phi \pm S$	CV (%)
Sin Inhibidor	30.57 \pm 5.39	17.63	32.60 \pm 8.65	26.53
GABA	23.85 \pm 5.63	23.61	19.02 \pm 5.11	26.87
Taurina	20.75 \pm 5.07	24.43	21.83 \pm 6.67	30.55

Cuadro 3.12 (I y II): Flujo medio de acamprosato en los grupos **CONTROL** y **CRÓNICO** a la concentración de **1000 μM** (tabla I) y **100 μM** (tabla II) en ausencia y en presencia de distintos **inhibidores** a la concentración de 40 mM. También se detalla la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) para cada concentración ensayada en cada grupo.

GRUPO CONTROL					
Flujo de Acamprosato a través de la membrana de los microvilli (nmol/cm ² ·h)					
Concentración de Acamprosato: 100 µM					
	Concentración de Inhibidor (mM)				
	Sin inhibidor	Taurina			Taurina + GABA
		10	20	80	40 + 40
	23.67	20.69	19.07	16.27	16.06
	28.93	28.61	19.74	20.58	17.68
	24.94	20.69	25.56	24.42	16.41
	38.07	29.86	21.87	26.48	25.48
	37.68	33.45	18.08	21.94	25.99
		28.18		18.64	16.36
					22.92
φ ± S	30.66 ± 6.87	25.68 ± 7.35	20.86 ± 2.97	21.39 ± 3.74	20.13 ± 4.50
CV (%)	22.40	28.60	14.23	17.48	22.35

Cuadro 3.14: Flujo de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos obtenidos en el grupo **CONTROL** a la concentración de **100 µM del fármaco** en ausencia y en presencia del inhibidor **Taurina**, determinado a distintas concentraciones (10, 20 y 80 mM), y en presencia de una mezcla compuesta de Taurina y GABA, ambos inhibidores a la concentración de 40 mM. También se detalla el flujo medio (ϕ), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

3.3.1 Comparación de los flujos de acamprosato en ausencia y en presencia de inhibidor

Para comprobar la influencia de los inhibidores sobre la absorción del acamprosato se compararon los flujos medios del fármaco obtenidos en ausencia y en presencia de los distintos inhibidores ensayados en los dos grupos de experimentación, grupo *Control* y grupo *Crónico*. Para dicha comparación estadística se ha utilizado un ANOVA de una vía. Cuando el ANOVA detectó diferencias estadísticamente significativas, se aplicó el método de Dunnet. Con este método se ha comparado el flujo medio de acamprosato en ausencia de inhibidor con los flujos obtenidos tanto en presencia de distintos inhibidores (*Cuadros 3.8 a 3.11*) como en presencia de concentraciones diferentes de un mismo inhibidor (*Cuadro 3.13*).

En el *Cuadro 3.14 (I y II)* se muestra el resultado del ANOVA para el grupo *Control* y *Crónico* a la concentración ensayada de acamprosato de 1000 μM , y en la *Gráfica 3.5* se representan los flujos medios de acamprosato con sus desviaciones estándar en presencia de los distintos aminoácidos estudiados en ambos grupos. Como se observa, la presencia de los distintos aminoácidos no modificó el valor del flujo de acamprosato en las condiciones ensayadas en ninguno de los dos grupos.

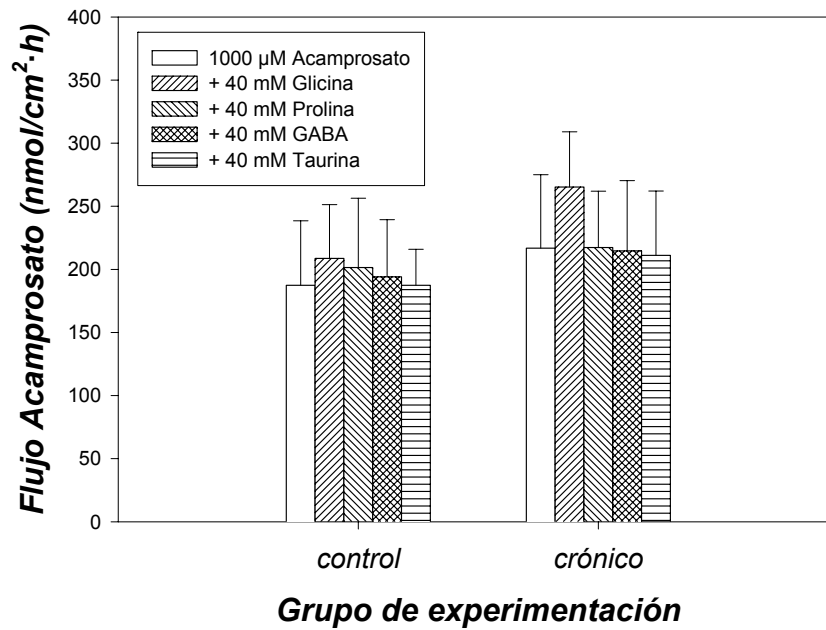
A la concentración de 100 μM de acamprosato sí se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el flujo del fármaco en presencia de GABA y de taurina en ambos grupos, control y crónico (ver *Cuadros 3.15 y 3.16*, respectivamente; en la *Gráfica 3.6* se representan los flujos medios de acamprosato en presencia de GABA y de taurina).

Cuando se estudió el efecto de concentraciones crecientes de un mismo inhibidor, la taurina (*Cuadro 3.17*), se detectaron diferencias estadísticamente significativas en el flujo de acamprosato a la concentración de 100 μ M en presencia de taurina a las concentraciones de 20 y 80 mM y con la combinación de taurina y GABA a la concentración de 40 mM cada uno. En la *Gráfica 3.7* se representan los flujos medios de acamprosato con sus desviaciones estándar en la condición ensayada.

GRUPO CONTROL (I) Concentración de Acamprosato: 1000 μM Ensayo de inhibición en presencia de Glicina, Prolina, GABA y Taurina					
Análisis de varianza.					
<u>Fuente</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Grados de libertad</u>	<u>Media cuadrática</u>	<u>F_{Snedecor}</u>	<u>Nivel de probabilidad</u>
Entre grupos	1955.664	4	488.9160	0.244	0.9108 (NS)
Error	52135.527	26	2005.2126		
Total (corregido)	54091.191	30			

GRUPO CRÓNICO (II) Concentración de Acamprosato: 1000 μM Ensayo de inhibición en presencia de Glicina, Prolina, GABA y Taurina					
Análisis de varianza.					
<u>Fuente</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Grados de libertad</u>	<u>Media cuadrática</u>	<u>F_{Snedecor}</u>	<u>Nivel de probabilidad</u>
Entre grupos	10818.183	4	2704.5456	1.022	0.4135 (NS)
Error	71421.305	27	2645.2335		
Total (corregido)	82239.487	31			

Cuadro 3.14 (I y II): Resultados del análisis estadístico de los flujos de **acamprosato** a la concentración de **1000 μ M** determinados en el grupo **CONTROL (I)** y **CRÓNICO (II)**, en ausencia y en presencia de los distintos inhibidores a la concentración de 40 mM. (NS: no existen diferencias estadísticamente significativas; S: diferencias estadísticamente significativas).



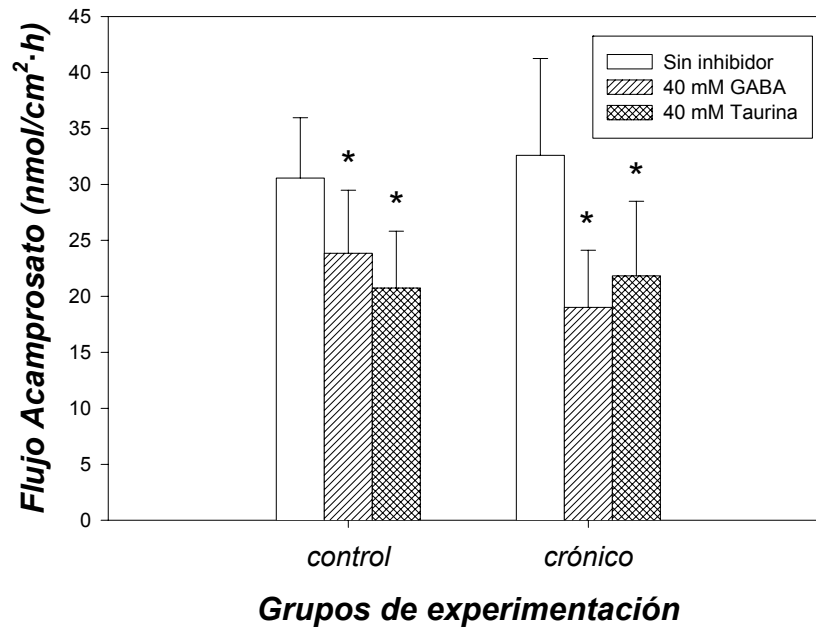
Gráfica 3.5: Representación comparativa de los flujos medios de **acamprosato** a la concentración de **1000 µM** ensayado en ausencia y en presencia de inhibidores (**glicina, prolina, GABA y taurina**) a la concentración de **40 mM** y de las desviaciones estándar obtenidas en los grupos de experimentación **CONTROL** y **CRÓNICO**. Las pruebas estadísticas no revelaron la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre el grupo (control) y cada uno de los distintos inhibidores usados en los grupos de experimentación.

GRUPO CONTROL Concentración de Acamprosato: 100 μM Ensayo de inhibición en presencia de GABA y Taurina					
Análisis de varianza.					
<u>Fuente</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Grados de libertad</u>	<u>Media cuadrática</u>	<u>F_{Snedecor}</u>	<u>Nivel de probabilidad</u>
Entre grupos	470.498	2	235.249	8.232	0.0019 (S)
Error	685.862	24	28.5776		
Total (corregido)	1156.361	26			
Método de Dunnet Comparación con el flujo medio de Acamprosato sin inhibidor					
	<u>Inhibidor (40 mM)</u>	<u>Significación</u>			
	GABA	S ($p < 0.005$)			
	Taurina	S ($p < 0.005$)			

Cuadro 3.15: Resultado del análisis estadístico de los flujos de acamprosato a la concentración de 100 μ M, en ausencia y en presencia de los distintos inhibidores a la concentración de 40 mM, y de la comparación, utilizando el método de Dunnet, del valor de flujo en ausencia de inhibidor con el valor de flujo de acamprosato en presencia de inhibidor. Resultados obtenidos en el grupo **CONTROL**. (S: diferencias estadísticamente significativas).

GRUPO CRÓNICO Concentración de Acamprosato: 100 μM Ensayo de inhibición en presencia de GABA y Taurina					
Análisis de varianza.					
<u>Fuente</u>	<u>Suma de cuadrados</u>	<u>Grados de libertad</u>	<u>Media cuadrática</u>	<u>F_{Snedecor}</u>	<u>Nivel de probabilidad</u>
Entre grupos	642.140	2	321.070	6.208	0.0109 (S)
Error	775.756	15	51.717		
Total (corregido)	1417.893	17			
Método de Dunnet Comparación con el flujo medio de Acamprosato sin inhibidor					
	<u>Inhibidor (40 mM)</u>	<u>Significación</u>			
	GABA	S ($p < 0.005$)			
	Taurina	S ($p < 0.005$)			

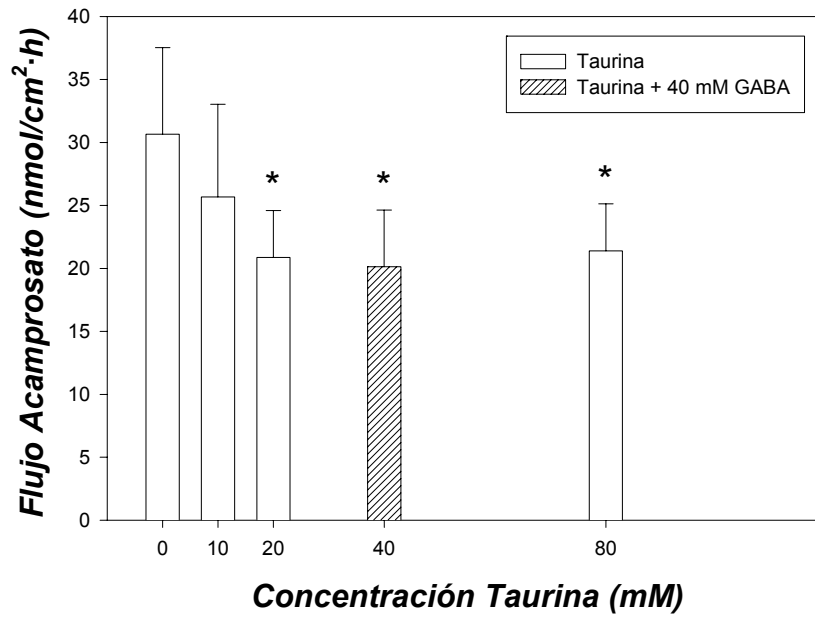
Cuadro 3.16: Resultado del análisis estadístico de los **flujos de acamprosato** a la concentración de **100 μ M**, en ausencia y en presencia de los distintos inhibidores a la concentración de 40 mM, y de la comparación, utilizando el método de Dunnet, del valor de flujo en ausencia de inhibidor con el valor de flujo de acamprosato en presencia de inhibidor. Resultados obtenidos en el grupo **CRÓNICO**. (S: diferencias estadísticamente significativas).



Gráfica 3.6: Representación comparativa de los flujos medios de **acamprosato** a la concentración de **100 μ M** ensayado en ausencia y en presencia de inhibidores (**GABA** y **taurina**) a la concentración de **40 mM** y de las desviaciones estándares obtenidas en los grupos de experimentación **CONTROL** y **CRÓNICO**. (*: Diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.005$).

GRUPO CONTROL Concentración de Acamprosato: 100 μM Ensayo de inhibición en presencia de Taurina(10, 20 y 80 mM) y mezcla (40 mM GABA + 40 mM Taurina)					
Análisis de varianza.					
<u>Fuente</u>	<u>Suma de</u> <u>cuadrados</u>	<u>Grados</u> <u>de</u> <u>libertad</u>	<u>Media</u> <u>cuadrática</u>	<u>F_{Snedecor}</u>	<u>Nivel de</u> <u>probabilidad</u>
Entre grupos	425.780	4	106.441	3.726	0.0170 (S)
Error	685.640	24	28.569		
Total (corregido)	1111.420	28			
Método de Dunnet Comparación con el flujo medio de Acamprosato sin inhibidor					
<u>Taurina (mM)</u>		<u>Significación</u>			
10		NS			
20		S (p<0.005)			
80		S (p<0.005)			
<u>Taurina + GABA</u> <u>(mM)</u>		<u>Significación</u>			
40 + 40		S (p<0.005)			

Cuadro 3.17: Resultado del análisis estadístico de los flujos de acamprosato a la concentración de 100 μ M, en ausencia y en presencia de concentraciones crecientes de Taurina, y de la comparación, utilizando el método de Dunnet, del valor de flujo en ausencia de inhibidor con el valor de flujo de acamprosato en presencia de inhibidor. Resultados obtenidos en el grupo **CONTROL**. (NS: no existen diferencias estadísticamente significativas; S: diferencias estadísticamente significativas).



Gráfica 3.7: Representación gráfica de los flujos medios de **acamprosato** a la concentración de **100 μ M**, y de las desviaciones estándar, obtenidos en presencia y ausencia de concentraciones crecientes de **taurina** (10, 20 y 80 mM), así como en presencia de una mezcla compuesta por **taurina y GABA** (ambos a la concentración de 40 mM). Dichos ensayos se han llevado a cabo sobre el grupo **CONTROL**. (*: Diferencias estadísticamente significativas, $p < 0.005$).

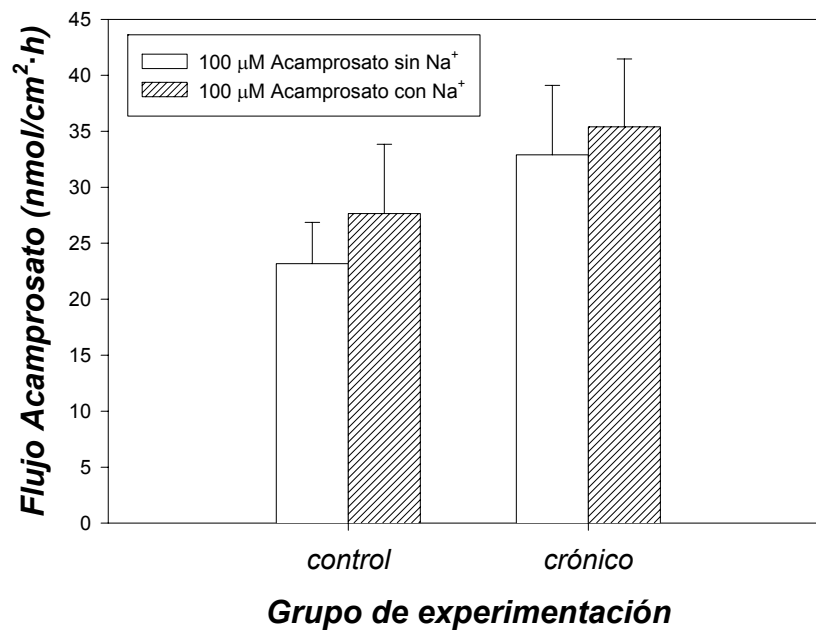
3.4 INFLUENCIA DEL Na^+ EN EL TRANSPORTE INTESTINAL DEL ACAMPROSATO

Para estudiar la influencia del Na^+ en el transporte intestinal de acamprosato se han determinado los flujos de acamprosato en ausencia y en presencia de Na^+ . Para ello se ha calculado el flujo utilizando dos condiciones de incubación distintas: presencia y ausencia de Na^+ .

En el *Cuadro 3.18* se muestran los valores individuales de flujo obtenidos en ausencia y en presencia de Na^+ en los grupos *Control* y *Crónico*. También se detallan los flujos medios con su desviación estándar y el coeficiente de variación. La comparación de dichas medias no ha revelado la existencia de diferencias estadísticamente significativas (prueba t Student) en ninguno de los grupos ensayados, control y crónico. En la *Gráfica 3.8* se representan gráficamente los valores medios de flujo con su desviación estándar en ambos grupos.

ESTUDIO DE LA Na⁺ DEPENDENCIA				
<i>Flujo de Acamprosato a través de la membrana de los microvilli (nmol/cm²·h)</i>				
Concentración de Acamprosato: 100 µM				
	CONTROL		CRÓNICO	
	Con Na ⁺	Sin Na ⁺	Con Na ⁺	Sin Na ⁺
	19.84	22.69	34.35	30.65
	24.65	20.51	41.16	34.22
	27.94	21.94	39.17	43.25
	24.67	33.26	23.61	42.62
	20.92	35.87	32.02	29.27
	28.24	32.15	32.90	32.41
	19.41	27.12	27.09	
	19.66			
$\phi \pm S$	23.17±3.69	27.65±6.16	32.90±6.20	35.40±6.07
CV (%)	15.92	22.20	18.80	17.14

Cuadro 3.18: Flujos de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos obtenidos en el grupo **CONTROL** y **CRÓNICO** a la concentración de **100 µM del fármaco** en ausencia y en presencia de Na⁺. También se detalla el flujo medio (ϕ), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).



Gráfica 3.8: Flujos de acamprosato a través de la membrana de los microvilli de los enterocitos obtenidos en el grupo **CONTROL** y **CRÓNICO** a la concentración de **100 μM del fármaco** en ausencia y en presencia de Na⁺ en el medio de incubación.

Capítulo 4: DISCUSIÓN

El acamprosato es un compuesto sintético con una estructura similar al GABA y homólogo de la taurina (ambos aminoácidos endógenos) utilizado en el tratamiento de deshabituación alcohólica, conjuntamente con la terapia de soporte conductual. Tras su administración oral se observan pocas reacciones adversas, siendo las más frecuentes náuseas y diarreas. Sin embargo, el acamprosato administrado vía oral en la forma farmacéutica comercializada (comprimidos entéricos) posee una baja biodisponibilidad (Saivin y col., 1998), lo cual obliga a administrar dosis diarias altas (pacientes con peso ≥ 60 kg: 1998 mg/día; pacientes con peso < 60 kg: 1332 mg/día).

Sin embargo, a pesar de las altas dosis administradas la tolerancia al fármaco es generalmente buena, y parte de los efectos adversos observados son dosis dependiente y están relacionados con la molécula del calcio presente en la estructura del acamprosato (*Figura 1.4*) (Whitworth y col., 1996).

La biodisponibilidad del acamprosato administrado en forma de comprimido entérico en humanos es del $11 \pm 1\%$, con una alta variabilidad interindividual (Saivin y col., 1998). Como ya se ha mencionado en el capítulo de Antecedentes de la presente memoria, el acamprosato no se une a las proteínas plasmáticas y no se sufre metabolización. Tampoco parece que su degradación a nivel del lumen intestinal o en las células intestinales, contribuyan a su baja biodisponibilidad (Saivin y col., 1998).

Así pues, la caracterización del mecanismo de absorción del acamprosato puede ayudar a entender su baja biodisponibilidad y a buscar estrategias que permitan optimizar la posología del acamprosato, de forma que se pudiera disminuir la dosis diaria a administrar y, por tanto, la incidencia de reacciones adversas, con el consiguiente beneficio para el paciente.

4.1 CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO DE ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO

A pesar de la bibliografía generada en torno al acamprosato, tanto en lo referente a estudios de eficacia como a investigación básica, centrada fundamentalmente en el estudio de su mecanismo de acción, el mecanismo de absorción del acamprosato ha sido muy poco estudiado. De hecho, existen pocos trabajos que hayan abordado el tema del estudio del mecanismo de absorción, y los pocos estudios que existen son incluso contradictorios. Por ejemplo, en el estudio llevado a cabo en 1988 por Chabenat y col., los autores concluyeron que, como consecuencia de las propiedades fisicoquímicas del acamprosato, este fármaco atravesaría las barreras biológicas con la ayuda de transportadores. Sin embargo,

posteriormente Saivin y col. (1998), postularon que la principal vía de absorción era la paracelular. No obstante, los autores no aportaban ninguna evidencia experimental que explicase dicho razonamiento.

El principal objetivo del presente trabajo ha sido la caracterización del mecanismo de absorción intestinal del acamprosato. Para ello, se diseñaron una serie de experimentos utilizando una técnica de absorción *in vitro* (Schultz y col., 1967) que permite la determinación de la velocidad de absorción instantánea a distintas concentraciones. Mediante la sustitución de estas velocidades o flujos en la ecuación diferencial de velocidad de absorción pasiva (Ecuación 1.6), es posible determinar la constante de absorción intestinal de orden uno del fármaco. Esta técnica presenta la ventaja de obtener hasta ocho datos experimentales por cada animal, reduciendo de un modo significativo el número de animales de experimentación utilizados. Aunque, al ser una técnica *in vitro*, tiene como inconveniente fundamental la falta de aporte sanguíneo en el tramo intestinal que se ensaya. A pesar de ello es posible garantizar la viabilidad del tejido mediante el aporte de oxígeno y nutrientes, durante el tiempo que dura el ensayo. Los experimentos se han llevado a cabo sobre el tramo medio del intestino delgado de la rata, ante la posibilidad de que el acamprosato pudiera utilizar los transportadores de los aminoácidos presentes mayoritariamente en este segmento del intestino (Munck y col., 1994).

Con el objetivo de evidenciar la posible existencia de absorción del fármaco tanto por difusión pasiva como a través de un mecanismo mediado por transportadores se estudió la velocidad de absorción en un amplio intervalo de concentraciones (de 10 a 80000 μM) y utilizando hasta once concentraciones distintas de acamprosato, de forma que cubriese las concentraciones teóricas que se alcanzarían a nivel intestinal en un tratamiento estándar con el fármaco (Saivin y col., 1998; Zornoza-Sabina, 2003).

Los resultados obtenidos en el grupo de experimentación *Control* (animales alimentados con una dieta líquida) muestran claramente que el flujo del fármaco a través de la membrana intestinal aumenta linealmente al incrementar la concentración, sin que se detecte indicio de saturación. El análisis cinético del flujo de acamprosato a través del borde en cepillo de la membrana de los enterocitos indican claramente que el principal mecanismo que utiliza el fármaco para su absorción intestinal es la **difusión pasiva**, caracterizada por la constante de velocidad de absorción de primer orden ($k_a=0.2134 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$, $r=0.9987$). Dicha constante se ha obtenido mediante regresión lineal por mínimos cuadrados de los valores de flujo obtenidos experimentalmente frente a las concentraciones ensayadas (*Cuadro 3.4 y Gráfica 3.1*).

El resultado obtenido en la presente memoria concuerda con lo que otros autores habían postulado (Saivin y *col.*, 1998). Como ya se ha indicado anteriormente, en dicho trabajo, se comenta que la absorción mayoritaria debía ser a través de la ruta paracelular, si bien, hasta el momento ni se había demostrado ni se había cuantificado *in vitro* la constante de absorción intestinal del acamprosato.

Ahora bien, la magnitud de la constante de absorción obtenida para el acamprosato en el grupo de experimentación *Control* ($k_a=0.2134 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) no es tan baja como cabría esperar, teniendo en cuenta la baja biodisponibilidad del fármaco en humanos (11%). De hecho, si se compara la constante de velocidad de absorción del acamprosato con la k_a de la antipirina ($k_a=0.220 \text{ cm}\cdot\text{h}^{-1}$) (Más Serrano, 1997) éstas son similares en magnitud (ambas constantes obtenidas utilizando la misma técnica experimental). Si tenemos en cuenta que la antipirina es un fármaco con una absorción intestinal rápida y completa, y que su biodisponibilidad es alta (Torres-Molina y *col.*, 1992), en base al valor de la k_a obtenida no podemos concluir que la absorción del acamprosato a nivel intestinal en la rata sea baja. Sin embargo, esta discordancia entre nuestros datos y los obtenidos en humanos se puede

explicar por distintas razones. En primer lugar, con la técnica experimental empleada, la velocidad de absorción a través del borde en cepillo de la membrana de los enterocitos se mide en un corto espacio de tiempo, tan solo 30 segundos (velocidad de absorción instantánea), y por tanto, bajo estas condiciones existen fenómenos capaces de reducir la absorción que no pueden ser detectados. Uno de estos posibles fenómenos es la existencia de sistemas de secreción del fármaco desde el interior de los enterocitos hacia el lumen. La glicoproteína-P es uno de los sistemas de secreción existente en el lumen intestinal. En general, sus posibles sustratos son compuestos de carácter lipófilo, como por ejemplo paclitaxel o grepafloxacin (Sun y *col.*, 2004). No obstante, también se ha observado que algunos fármacos hidrófilos pueden ser sustratos de este sistema (Aungst y Saitoh, 1996). Por ello, cabe la posibilidad de que la glicoproteína-P sea la responsable de la baja biodisponibilidad del acamprosato observada en humanos.

En segundo lugar, hay que considerar que en los ensayos realizados en esta memoria el fármaco se ha utilizado en disolución acuosa, mientras que en los estudios realizados en humanos, el acamprosato se administró en forma de comprimido con recubrimiento entérico.

Por último, hay que tener en cuenta que la biodisponibilidad de acamprosato en ratas es prácticamente el doble de la obtenida en humanos, 20% frente al 11%, respectivamente (Zornoza y *col.*, 2003).

4.2 INFLUENCIA DE LA DIETA Y DEL ALCOHOL EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO

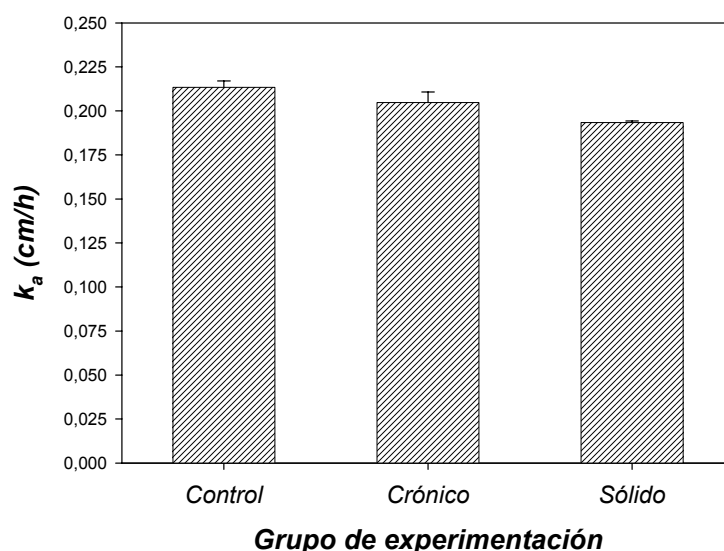
Con el objetivo de estudiar la influencia que pueda tener el *alcoholismo* sobre la absorción del acamprosato, así como el tipo de dieta (dieta sólida frente a líquida), en la presente memoria se ha caracterizado

el mecanismo de absorción del fármaco en tres condiciones experimentales distintas: animales alimentados con una dieta líquida (grupo *Control*), animales alimentados con una dieta alcohólica líquida (grupo *Crónico*) y animales alimentados con una dieta sólida (grupo *Sólido*).

El modelo de alcoholización utilizado en el grupo *Crónico* es el que establecieron Lieber y DeCarli en los años 60 (DeCarli y Lieber, 1967), ampliamente utilizado y validado por nuestro equipo de investigación (Ferrando y *col.*, 1999; Martin-Algarra y *col.*, 1998; Merino y *col.*, 1997). Dicho modelo se basa en el uso de una dieta líquida equilibrada y adecuada, para proporcionar un crecimiento continuado al animal (*Cuadro 2.2*), a la que se le adiciona el etanol de manera que aporte un determinado porcentaje de las calorías totales. En el caso de la rata se ha observado que la concentración óptima de etanol que se debe adicionar a la dieta líquida es del 5% (V/V). Esta concentración equivale al 36% de las calorías totales ingeridas. Si se utilizan concentraciones menores de alcohol no se alcanzan niveles plasmáticos adecuados para producir una correcta alcoholización crónica y, por otra parte, concentraciones superiores pueden ocasionar la muerte del animal (Lieber y DeCarli, 1994).

En el modelo utilizado en el grupo de experimentación *Control*, los animales se alimentaron con una dieta líquida análoga a la etanólica, pero en la que el alcohol se reemplaza por la cantidad necesaria de hidratos de carbono (dextrina-maltosa) para que resulte isocalórica cuando se compara con la dieta alcohol (grupo *Crónico*). Utilizando este tipo de dieta, ambos grupos ingieren la misma cantidad de nutrientes, exceptuando los carbohidratos. De esta forma, se puede asegurar que de observarse algún efecto en el grupo *Crónico*, éstos se deben exclusivamente al alcoholismo crónico y no a otros factores como son el tipo de dieta o un déficit de nutrientes.

No obstante, y con el fin de poder interpretar correctamente los resultados, también se incluyó *a priori* un grupo de experimentación en el que los animales tuvieron libre acceso al agua y a una dieta sólida estándar (grupo *Sólido*). Aunque ya disponíamos de datos de un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación en el que se comprobó que el tipo de dieta (sólida frente a líquida) no modificaba la absorción de la antipirina, fármaco modelo de difusión pasiva (Fernandez-Villalba, 1996), la diferente lipofilia entre el acamprosato y la antipirina, obligó a la realización de una nueva comparación entre ambos grupos que permitió confirmar este fenómeno.



Gráfica 4.1: Representación de las constantes de absorción de primer orden (k_a) con sus desviaciones estándar para los grupos de experimentación **CONTROL**, **CRÓNICO** y **SÓLIDO**.

Los valores de la constante de velocidad de absorción con sus correspondientes desviaciones estándar para los tres grupos estudiados (*Control*, *Crónico* y *Sólido*) se representa en la *Gráfica 4.1* (los valores

individuales están recogidos en los *Cuadros 3.6 a 3.8*). Como se puede apreciar, por una parte, el intervalo de valores de la constante de velocidad de absorción (k_a) es muy estrecho (0.2134 ± 0.0036 , 0.2047 ± 0.0061 y 0.1934 ± 0.0009 $\text{cm} \cdot \text{h}^{-1}$, para los grupos *Control*, *Crónico* y *Sólido*, respectivamente); y por otro, la estimación de la misma es muy precisa ya que la regresión se ha realizado con al menos diez concentraciones distintas (CV de la k_a : 1.69, 2.98 y 0.47% para los grupos *Control*, *Crónico* y *Sólido*, respectivamente). Estas dos características hacen que, aunque los resultados de la comparación estadística muestran diferencias estadísticamente significativas entre las constantes de velocidad de absorción ($p < 0.05$), al ser la diferencia en magnitud entre ellas relativamente pequeña (entorno al 5% para los tres grupos), éstas son despreciables desde el punto de vista práctico y se podría considerar que la constante de velocidad de absorción del acamprosato es la misma en los tres grupos estudiados.

De estos datos se puede concluir, por una parte, que en las condiciones experimentales ensayadas el alcoholismo crónico no modifica la absorción del acamprosato en el yeyuno de la rata. Además estos resultados concuerdan con otros datos publicados por nuestro grupo previamente, en los que se demostraba que el tratamiento alcohólico crónico (grupo *Crónico*) afectaba solo al transporte intestinal pasivo de moléculas muy hidrofílicas, como por ejemplo la taurina, y que este efecto disminuía conforme aumentaba la lipofilia de la molécula (Merino y *col.*, 1997; Martín-Algarra y *col.*, 1998). De esta forma, el acamprosato, que es un homólogo de la taurina al que se le ha añadido un grupo acetilo, poseería un comportamiento más lipófilo que la taurina y por tanto, explicaría que el etanol no modificase su transporte a nivel intestinal al contrario de lo que ocurre con la taurina. Además, nuestros resultados confirmarían los publicados por Saivin y *col.* (1998) que afirmaban que los parámetros farmacocinéticos de una serie de pacientes con insuficiencia hepática crónica o aguda de origen alcohólico, eran comparables a los

parámetros de voluntarios sanos a los que se les había administrado la misma dosis. Dichos autores también publican un estudio farmacocinético realizado con pacientes alcohólicos que habían dejado de beber como mínimo cinco días antes de realizarse el ensayo, en el que se concluía que la disposición del acamprosato en pacientes con dependencia alcohólica es similar a la de los voluntarios sanos (Pelc, 1993, citado en Saivin y col., 1998).

Así mismo, de los anteriores resultados también se puede concluir que el tipo de dieta (grupo *Control* frente a grupo *Sólido*) no altera la absorción del acamprosato a nivel intestinal, por lo que en futuros estudios, en los que se utilice esta técnica experimental y moléculas con una lipofilia similar, sería posible la utilización de animales alimentados con una dieta sólida estándar. La implicación a nivel económico que supondría la utilización de una dieta estándar para alimentar a los animales no alcohólicos en lugar de la dieta líquida empleada en la presente memoria, es muy importante, no solo desde el punto de vista del incremento del coste de la preparación de la dieta, sino también del esfuerzo que supone el cuidado de los animales de experimentación.

4.3 INFLUENCIA DE DISTINTOS AMINOÁCIDOS EN LA ABSORCIÓN INTESTINAL DEL ACAMPROSATO

Como se ha comentado anteriormente, nuestros resultados son concluyentes en cuanto a que el principal mecanismo de absorción del acamprosato es la difusión pasiva. Sin embargo, debido a la similitud estructural del acamprosato con distintos aminoácidos fisiológicos que se absorben a nivel intestinal por medio de portadores (*Figura 1.5*), no se puede descartar totalmente la participación que determinados transportadores puedan tener en la absorción del fármaco. Por este motivo, se diseñaron paralelamente a los estudios de caracterización del mecanismo de absorción intestinal estudios de inhibición, con el objetivo

de evaluar el posible papel que estos transportadores pudieran tener en la absorción del fármaco. En dichos estudios se cuantificó la velocidad de absorción del acamprosato a través del borde en cepillo de la membrana de los enterocitos en presencia de determinados aminoácidos endógenos estructuralmente relacionados con el acamprosato (*Figura 1.5*) a distintas concentraciones.

En estudios previos se ha demostrado que el alcoholismo crónico disminuye la absorción de taurina (aminoácido estructuralmente relacionado con el acamprosato) y que esta absorción se realiza a través de un sistema de portadores (Munck y *col.*, 1994; Martin-Algarra y *col.*, 1998; Martin-Algarra y *col.*, 1995). Con el objetivo de poder evaluar la posible influencia que pueda tener el alcoholismo sobre los potenciales transportadores del acamprosato, los estudios de inhibición se han llevado a cabo tanto en el grupo *Control* como en el *Crónico*.

Los resultados obtenidos del primer estudio de inhibición muestran que el flujo de acamprosato a la concentración de 1000 μM no se modifica en presencia de glicina, prolina, GABA o taurina a la concentración de 40 mM, tanto en el grupo *Control* como en el grupo *Crónico*. Sin embargo, sí se observa una disminución estadísticamente significativa del flujo de acamprosato a la concentración de 100 μM , en presencia de GABA y taurina a las mismas concentraciones utilizadas en el primer estudio. Dicha disminución se observa en ambos grupos y es de la misma magnitud. El resultado de este último ensayo implicaría que la absorción del acamprosato se podría realizar, al menos en parte, a través de un sistema de portadores. Así pues, como consecuencia de los resultados obtenidos y en las condiciones experimentales utilizadas, se podría concluir que la absorción del acamprosato se realiza mayoritariamente mediante difusión pasiva aunque a concentraciones bajas se evidencia la existencia de un sistema de portadores.

Los distintos resultados obtenidos en estos estudios de inhibición pueden ser consecuencia de la distinta concentración de acamprosato utilizada en los ensayos. Es decir, a la concentración de 1000 μM , la

difusión pasiva sería probablemente el componente principal en la absorción del fármaco (posiblemente a esta concentración el proceso de absorción mediado por portadores esté saturado), por lo que la presencia de otros aminoácidos no afecta a su flujo. Sin embargo, al disminuir la concentración de acamprosato, el componente de la absorción mediado por transportadores no es tan despreciable frente al componente de la difusión pasiva del fármaco, por lo que, los posibles fenómenos de inhibición se detectan mucho mejor.

Estos resultados sugieren que el transportador de los iminoácidos podría estar implicado en el transporte especializado del acamprosato en el intestino de la rata. Además, al igual que ocurre con la constatación de velocidad de absorción, no existe diferencia en el flujo de acamprosato entre los grupos *Control* y *Crónico* a las concentraciones ensayadas.

Los resultados de un tercer estudio de inhibición, realizado sólo en el grupo control, en el que se midió el flujo de acamprosato a la concentración de 100 μM en presencia de taurina a distintas concentraciones y de una mezcla de taurina y GABA (ambos a la concentración de 40 mM), muestran que la máxima inhibición del flujo de acamprosato se logra a la concentración de 20 mM de taurina y que la adición de un segundo inhibidor (GABA) no logra una mayor reducción del flujo. Aunque no se ha realizado el análisis cinético de la inhibición, se puede asumir que dada su relación estructural con los aminoácidos estudiados (taurina y GABA), dicha inhibición podría ser de tipo competitivo.

Se ha comprobado que la taurina a nivel intestinal se absorbe a través del portador de iminoácidos, siendo este transporte $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$ dependiente (Munck y *col.*, 1994; Polache y *col.*, 1993; Munck y Munck, 1992). Por este motivo se realizó un último estudio de inhibición en el que se analizó si el transporte de acamprosato mediado por portadores era Na^+ dependiente, al igual que ocurre con la taurina. De acuerdo con los resultados obtenidos, el flujo de acamprosato a la concentración de

100 μM no es Na^+ dependiente, obteniéndose valores incluso ligeramente superiores cuando se eliminó este catión del medio.

Es difícil establecer la posible repercusión práctica de la demostración del hallazgo de la existencia de un mecanismo de absorción del acamprosato mediado por portadores que además se pondría de manifiesto sólo a bajas concentraciones del fármaco. En la dieta habitualmente no se encuentran aminoácidos como la taurina o el GABA, aminoácidos que en los ensayos de inhibición ya comentados, han demostrado que la velocidad de absorción del acamprosato disminuye en su presencia, por lo que resulta aún más complicado conocer el alcance de estos hallazgos.

Por otro lado, hay que tener en cuenta, que aunque parte de la absorción del acamprosato se realice mediante transportadores en el intestino de rata y suponiendo que este hallazgo sea extrapolable al intestino humano, el principal mecanismo de absorción del acamprosato es claramente la difusión pasiva. Lo que no podemos establecer, a raíz de los resultados presentados en la presente memoria, es el tipo de absorción pasiva que utiliza el fármaco, es decir, si la difusión pasiva se realiza vía transcelular o vía paracelular. La caracterización de este extremo es necesario si se quiere intentar mejorar tanto el perfil de absorción del fármaco como su biodisponibilidad, ya que dependiendo del tipo de difusión pasiva el abordaje desde el punto de vista galénico será distinto. Así pues, si la absorción se realizara vía paracelular, la utilización de determinados promotores de la absorción, como son los chitosanos, incrementarían la absorción del fármaco (Kotze y *col.*, 1997; Schipper y *col.*, 1996), lo que se traduciría en una disminución de la dosis a administrar a los pacientes. Mientras que si la absorción se llevara a cabo vía transcelular se podrían utilizar tensioactivos como promotores de la absorción (Bermejo y *col.*, 1991). Esta disminución en la dosis diaria a administrar supondría un beneficio directo para los propios pacientes, ya que posiblemente disminuirían las reacciones adversas a nivel digestivo. Además la simplificación de la pauta posológica podría mejorar la

adherencia al tratamiento y el cumplimiento terapéutico (la presentación farmacéutica existente actualmente en el mercado son comprimidos de 333 mg y la pauta posológica es de 666 mg, dos comprimidos de 333 mg, cada 8 horas).

Capítulo 5: RESUMEN y CONCLUSIONES

El acamprosato, comercializado en varios países de la Unión Europea y autorizado recientemente en EE.UU., está indicado en la terapia de mantenimiento de la abstinencia en pacientes dependientes al alcohol sometidos a tratamiento deshabitador. Este fármaco presenta como principal problema su baja biodisponibilidad oral en humanos (aproximadamente un 10%) cuando se administra en forma de comprimidos con recubrimiento gastrorresistente. A pesar de los numerosos estudios realizados, en el momento de la realización de la presente memoria se desconocían aspectos relevantes de su farmacocinética, como son los mecanismos y rutas utilizados para su absorción intestinal.

Por este motivo y con la finalidad de identificar posibles causas de su escasa biodisponibilidad oral, el principal objetivo de este proyecto ha sido el estudio del mecanismo de absorción intestinal del acamprosato en el tramo medio del intestino delgado de rata, utilizando para ello una técnica *in vitro*. Además, se ha estudiado si la influencia de otros factores como son el alcoholismo, el tipo de dieta o la existencia de ciertos aminoácidos pueden influir en su absorción.

Los estudios realizados indican que el acamprosato se absorbe mayoritariamente mediante difusión pasiva. Además, en nuestras condiciones de experimentación, factores como el alcoholismo y el tipo de dieta no afectan desde el punto de vista práctico a la absorción del fármaco. Por último, los estudios de inhibición de la velocidad de absorción realizados con determinados aminoácidos inhibidores (glicina, prolina, GABA y taurina) indican que, a la concentración de 40 mM, estos compuestos son capaces de disminuir la absorción de acamprosato, sugiriendo que el transportador de los iminoácidos podría estar implicado en el transporte especializado del fármaco.

Así, las conclusiones más relevantes del trabajo que se presentan son las siguientes:

1. La absorción del acamprosato en el tramo medio del intestino delgado de la rata se realiza mayoritariamente mediante difusión pasiva en el amplio ámbito de concentraciones estudiadas. Por tanto, la absorción del fármaco a nivel intestinal se podría realizar, bien por difusión a través de la membrana lipídica (vía transcelular) o bien a través de las uniones estrechas existentes entre los enterocitos (vía paracelular).

2. La comparación estadística de las tres constantes de velocidad de absorción obtenidas en los grupos experimentales estudiados, grupo *Control*, *Crónico* y *Sólido* (0.2134, 0.2047 y 0.1934 cm·h⁻¹, respectivamente), indican la existencia de diferencias estadísticamente significativas. No obstante, esta diferencia no tiene un alcance práctico ya que los valores de las constantes de absorción son muy similares. Por lo tanto se puede concluir que el alcoholismo crónico no ejerce ninguna influencia sobre la absorción del acamprosato. Además, el tipo de dieta utilizada (líquida frente a sólida) tampoco modifica la absorción del fármaco, de modo que para que futuras investigaciones se podría utilizar como grupo control animales alimentados con una dieta sólida estándar.
3. Los estudios de inhibición con compuestos estructuralmente relacionados con el acamprosato (GABA y taurina) indican que los transportadores de iminoácidos presentes en el intestino delgado de rata, podrían estar implicados en la absorción del fármaco a nivel intestinal. Sin embargo, su participación en el proceso global de absorción sería cuantitativamente poco importante y predominante solo a bajas concentraciones del fármaco ($\leq 100 \mu\text{M}$).
4. El flujo de acamprosato a la concentración de 100 μM se inhibe en presencia de concentraciones crecientes de taurina, obteniéndose la máxima inhibición (33%) a la concentración de 20 mM. No obstante, la implicación práctica de esta inhibición debe ser muy reducida por el hecho de que estos aminoácidos no se encuentran habitualmente en la dieta y porque mayoritariamente la absorción de acamprosato se realiza por difusión pasiva.

Capítulo 6: BIBLIOGRAFÍA

al Qatari M, Bouchenafa O y Littleton J.

Mechanism of action of acamprosate. Part II. Ethanol dependence modifies effects of acamprosate on NMDA receptor binding in membranes from rat cerebral cortex.

Alcohol Clin Exp Res 1998; **22**(4): 810-4.

Ariens EJ .

Drug design.

Med Chem 1975; **11-V**: 81-2.

Aubin HJ, Lehert P, Beaupere B, Parot P y Barrucand D.

Tolerability of the combination of acamprosate with drugs used to prevent alcohol withdrawal syndrome.

Alcoholim 1995; **31**: 25-38.

Aungst BJ y Saitoh H.

Intestinal absorption barriers and transport mechanism, including secretory transport of a cyclic peptide, fibrinogen antagonist.

Pharm Res 1996; **13**: 114-9.

Aurich C, Aurich JE y Klug E.

Naloxone affects gastrointestinal functions and behaviour in horses.
Dtsch Tierarztl Wochenschr 1993; **100**(8): 314-5.

Barrio Lera JP, Alvarez AI y Prieto JG.

Effects of ethanol on the pharmacokinetics of cephalexin and cefadroxil in the rat.
J Pharm Sci 1991; **80**(6): 511-6.

Bermejo MV, Pérez-Verona AT, Segura-Bono MJ, Martín-Villodre A, Pla-Delfina J y Garrigues TM.

Compared effects of synthetic and natural bile acid surfactants on xenobiotic absorption. I. Studies with polysorbate and taurocholate in rat colon.
International Journal of Pharmaceutics 1991; **69**: 221-31.

Besson J, Aeby F, Kasas A, Lehert P y Potgieter A.

Combined efficacy of acamprosate and disulfiram in the treatment of alcoholism: a controlled study.
Alcohol Clin Exp Res 1998; **22**(3): 573-9.

Bjarnason I, Smethurst P, Levi AJ y Peters TJ.

Intestinal permeability to ⁵¹Cr-EDTA in rats with experimentally induced enteropathy.
Gut 1985; **26**(6): 579-85.

Bjorkman DJ y Jessop LD.

Effects of acute and chronic ethanol exposure on intestinal microvillus membrane lipid composition and fluidity.
Alcohol Clin Exp Res 1994; **18**(3): 560-5.

Cano-Cebrian MJ, Zornoza T, Granero L y Polache A.

Intestinal absorption enhancement via the paracellular route by fatty acids, chitosans and others: a target for drug delivery.
Current Drug Delivery 2005; **2**(1): 9-22.

Cano-Cebrian MJ, Zornoza-Sabina T, Guerri C, Polache A y Granero L.

Local acamprosate modulates dopamine release in the rat nucleus accumbens through NMDA receptors: an in vivo microdialysis study.
Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol 2003; **367**(2): 119-25.

Chabenat C, Chretien P, Daoust M, Moore N, Andre D, Lhuintre JP, Saligaut C, Boucly P y Boismare F.

Physicochemical, pharmacological and pharmacokinetic study of a new GABAergic compound, calcium acetylhomotaurinate.

Methods Find Exp Clin Pharmacol 1988; **10**(5): 311-7.

Chang KJ, Cooper BR, Hazum E y Cuatrecasas P.

Multiple opiate receptors: different regional distribution in the brain and differential binding of opiates and opioid peptides.

Mol Pharmacol 1979; **16**(1): 91-104.

Chin JH y Goldstein DB.

Membrane-disordering action of ethanol: variation with membrane cholesterol content and depth of the spin label probe.

Mol Pharmacol 1981; **19**(3): 425-31.

COMBINE Study Research Group .

Testing combined pharmacotherapies and behavioral interventions for alcohol dependence (the COMBINE study): a pilot feasibility study.

Alcohol Clin Exp Res 2003; **27**(7): 1123-31.

Cooper SJ .

Benzodiazepine mechanisms and drinking in the water-deprived rat.

Neuropharmacology 1982; **21**(8): 775-80.

Courtyn J, Cornelissen B, Oltenfreiter R, Vandecapelle M, Slegers G y Strijckmans K.

Synthesis and assessment of [(11)C]acetylhomotaurine as an imaging agent for the study of the pharmacodynamic properties of acamprosate by positron emission tomography.

Nucl Med Biol 2004; **31**(5): 649-54.

Daoust M, Legrand E, Gewiss M, Heidbreder C, DeWitte P, Tran G y Durbin P.

Acamprosate modulates synaptosomal GABA transmission in chronically alcoholised rats.

Pharmacol Biochem Behav 1992; **41**(4): 669-74.

DeCarli LM y Lieber CS.

Fatty liver in the rat after prolonged intake of ethanol with a nutritionally adequate new liquid diet.

J Nutr 1967; **91**(3): 331-6.

Dewland PM .

A rising dose tolerance and pharmacokinetic study of calcium acetylhomotaurinate following single oral administration of a solution at four dose levels.

Lipha France 1991; **RD 298/17927**(data on file).

Dewland PM .

Report of the comparison of the plasma pharmacokinetics of acamprosate following a single oral dose to equal numbers of men and women.

Lipha France 1995a; **RD 298/20673**(data on file).

Dewland PM .

Report of the potential pharmacokinetic interaction of disulfiram with acamprosate.

Lipha France 1995b; **RD 298/20828**(data on file).

Dietmaier O, Mutschler E y Drugdex (R) Editorial Staff.

Acamprosate. Drugdex Drug Evaluations. MICROMEDEX(R) Healthcare Series Vol. 119. 2001.

Durbin, P., Hulot, T. & Chabac, S.

(1995) Pharmacodynamics and pharmacokinetics of acamprosate: an overview. En: *Acamprosate in relapse prevention of alcoholism* (ed M. Soyka), pp. 47-64. Springer, Stuttgart.

Fadda F y Rossetti ZL.

Chronic ethanol consumption: from neuroadaptation to neurodegeneration.

Prog Neurobiol 1998; **56**(4): 385-431.

Faingold CL, N'Gouemo P y Riaz A.

Ethanol and neurotransmitter interactions--from molecular to integrative effects.

Prog Neurobiol 1998; **55**(5): 509-35.

Faus Soler MT, Olcina Rodríguez J y Soler Company E.

Acamprosato: Nuevo fármaco en el tratamiento de la dependencia alcohólica.

Farm Hosp 1997; **21**(1): 1-10.

Fernandez-Villalba, E.

Influencia del alcoholismo crónico en la absorción intestinal de fármacos tipo en la rata: Antipirina.

Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. 1996

Ferrando R, Garrigues TM, Bermejo MV, Martin-Algarra R, Merino V y Polache A.

Effects of ethanol on intestinal absorption of drugs: in situ studies with ciprofloxacin analogs in acute and chronic alcohol-fed rats.

Alcohol Clin Exp Res 1999; **23**(8): 1403-8.

Ficha Técnica FDA.

Campral (R) (acamprosate calcium) Delayed-Release Tablets. Label information. FDA. Center for Drug Evaluation and Research. 2004.

Fleming, M., Mihic, S. J. & Harris, R. A.

(2001) Ethanol. En: *Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics*

(eds J. G. Hardman, L. E. Limbird & A. G. Gilman), pp. 429-45. The McGraw-Hill Companies, Inc., International Edition.

Fourtillan JB .

Pharmacokinetics and relative bioavailabilities of acetylhomotaurinate (AOTA) after oral administration of a single dose equal to 666 mg of calcium acetylhomotaurinate (AOTA-Ca) in six young healthy volunteers when given as aqueous solution at four dose levels.

Lipha France 1989; **AD 864 H**(data on file).

Fourtillan JB .

Pharmacokinetics of acetylhomotaurinate (AOTA) in young healthy volunteers subjects after single and multiple oral administrations of doses equal to 666 mg of calcium acetylhomotaurinate (AOTA-Ca).

Lipha France 1990; **AD 875 H**(Data on file).

Fourtillan JB .

Research of pharmacokinetic interactions between diazepam and acamprosate when given in combination on multiple oral dosing.
Lipha France 1995a; **AD 1026 H**(data on file).

Fourtillan JB .

Research of pharmacokinetic interactions between imipramine and acamprosate when given in combination on multiple oral dosing.
Lipha France 1995b; **AD 1135 H**(data on file).

Gewiss M, Heidbreder C, Opsomer L, Durbin P y De Witte P.

Acamprosate and diazepam differentially modulate alcohol-induced behavioural and cortical alterations in rats following chronic inhalation of ethanol vapour.
Alcohol Alcohol 1991; **26**(2): 129-37.

Goldstein DB .

Alcohol withdrawal reactions in mice: effects of drugs that modify neurotransmission.
J Pharmacol Exp Ther 1973; **186**(1): 1-9.

Guerri C y Grisolia S.

Chronic ethanol treatment affects synaptosomal membrane-bound enzymes.
Pharmacol Biochem Behav 1983; **18 Suppl 1**: 45-50.

Jackson, M. J.

(1987) Drug transport across gastrointestinal epithelia. En: *Physiology of the gastrointestinal tract*
(ed L. R. Johnson), pp. 1597-621. Raven Press, New York.

Jaillon P y Salvat M.

Pharmacokinetics study of intravenous administration of AOTAL (calcium acetylhomotaurinate) at single doses of 10, 20 and 30 mg/kg.
Lipha France 1991;(data on file).

Justel A, Alvarez AI, Alonso ML, del Estal JL, Villaverde C, Barrio JP y Prieto JG.

Influence of ethanol on gastric absorption and metabolism of albendazole and mebendazole.

Drug Alcohol Depend 1994; **36**(1): 49-55.

Kalant, H.

(1971) Absorption, diffusion, distribution and elimination of ethanol: effect on biological membranes. En: *The biology of alcoholism. Vol. 1.*

Biochemistry

(eds B. Kissi & H. Begleiter), pp. 1-62. Plenum Press, New York.

Kater RM, Roggin G, Tobon F, Zieve P y Iber FL.

Increased rate of clearance of drugs from the circulation of alcoholics.

Am J Med Sci 1969; **258**(1): 35-9.

Keshavarzian A, Fields JZ, Vaeth J y Holmes EW.

The differing effects of acute and chronic alcohol on gastric and intestinal permeability.

Am J Gastroenterol 1994; **89**(12): 2205-11.

Kiefer F, Jahn H, Tarnaske T, Helwig H, Briken P, Holzbach R, Kampf P, Stracke R, Baehr M, Naber D y Wiedemann K.

Comparing and combining naltrexone and acamprosate in relapse prevention of alcoholism: a double-blind, placebo-controlled study.

Arch Gen Psychiatry 2003; **60**(1): 92-9.

Kotze AF, Luessen HL, de Leeuw BJ, de Boer BG, Verhoef JC y Junginger HE.

N-trimethyl chitosan chloride as a potential absorption enhancer across mucosal surfaces: in vitro evaluation in intestinal epithelial cells (Caco-2).

Pharm Res 1997; **14**(9): 1197-202.

Krevsky B, Fisher RS y Cowan A.

Failure of (+)-naloxone to accelerate feline colonic transit.

Experientia 1990; **46**(2): 217-9.

Le Magnen J, Tran G, Durlach J y Martin C.

Dose-dependent suppression of the high alcohol intake of chronically intoxicated rats by Ca-acetyl homotaurinate.
Alcohol 1987; **4**(2): 97-102.

Lieber CS .

Interaction of alcohol with other drugs and nutrients. Implication for the therapy of alcoholic liver disease.
Drugs 1990; **40 Suppl 3**: 23-44.

Lieber CS y DeCarli LM.

Animal models of chronic ethanol toxicity.
Methods Enzymol 1994; **233**: 585-94.

Litten RZ y Allen JP.

Advances in development of medications for alcoholism treatment.
Psychopharmacology (Berl) 1998; **139**(1-2): 20-33.

Littleton J .

Acamprosate in alcohol dependence: how does it work?
Addiction 1995; **90**(9): 1179-88.

Ma TY, Nguyen D, Bui V, Nguyen H y Hoa N.

Ethanol modulation of intestinal epithelial tight junction barrier.
Am J Physiol 1999; **276**(4 Pt 1): G965-G974.

Martin-Algarra RV, Guerri C y Polache A.

Effect of chronic alcohol consumption in intestinal absorption of taurine and methionine in pregnant rats.
Ital J Gastroenterol 1995; **27**: 161.

Martin-Algarra RV, Polache A, Fernandez-Villalba E, Pla Delfina JM y Guerri C.

Influence of chronic alcohol intake on intestinal taurine and antipyrine transport in pregnant rats.
Alcohol Clin Exp Res 1998; **22**(2): 463-7.

Más Serrano, P.

Influencia del alcoholismo agudo en la absorción gastrointestinal de medicamentos en la rata: Antipirina.

Tesis de Licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia.
1997

Mas-Serrano P, Granero L, Martin-Algarra RV, Guerri C y Polache A.

Kinetic study of acamprosate absorption in rat small intestine.

Alcohol Alcohol 2000; **35**(4): 324-30.

Mason BJ, Goodman AM, Dixon RM, Hameed MH, Hulot T, Wesnes K, Hunter JA y Boyeson MG.

A pharmacokinetic and pharmacodynamic drug interaction study of acamprosate and naltrexone.

Neuropsychopharmacology 2002; **27**(4): 596-606.

Mayershon, M.

(1995) Principles of drug absorption. En: *Modern Pharmaceutics*

(eds G. S. Banker & C. T. Rothers), pp. 21-74. Marcel Denker, Inc., New York.

Merino V, Martin-Algarra RV, Rocher A, Garrigues TM, Freixas J y Polache A.

Effects of ethanol on intestinal absorption of drugs. I. In situ studies with ciprofloxacin analogs in normal and chronic alcohol-fed rats.

Alcohol Clin Exp Res 1997; **21**(2): 326-33.

Munck BG, Munck LK, Rasmussen SN y Polache A.

Specificity of the imino acid carrier in rat small intestine.

Am J Physiol 1994; **266**(4 Pt 2): R1154-R1161.

Munck LK y Munck BG.

Distinction between chloride-dependent transport systems for taurine and beta-alanine in rabbit ileum.

Am J Physiol 1992; **262**(4 Pt 1): G609-G615.

Naassila M, Hammoumi S, Legrand E, Durbin P y Daoust M.

Mechanism of action of acamprosate. Part I. Characterization of spermidine-sensitive acamprosate binding site in rat brain.

Alcohol Clin Exp Res 1998; **22**(4): 802-9.

Nalpas B, Dabadie H, Parot P y Paccalin J.

[Acamprosate. From pharmacology to therapeutics].

Encephale 1990; **16**(3): 175-9.

Overman GP, Teter CJ y Guthrie SK.

Acamprosate for the adjunctive treatment of alcohol dependence.

Ann Pharmacother 2003; **37**(7-8): 1090-9.

Pelc I .

Acamprosate pharmacokinetic study during the treatment of alcoholic patient following withdrawal.

Lipha France 1993; **AOTA-CIN PA1-AD 1054H**(data on file).

Persson J .

Alcohol and the small intestine.

Scand J Gastroenterol 1991; **26**(1): 3-15.

Polache A, Martin-Algarra RV, Guerri C y Pla-Delfina JM.

El alcoholismo: su influencia en la absorción de nutrientes, fármacos y xenobióticos.

Cienc Pharm 1996; **6**(1): 3-15.

Polache A, Munck LK y Munck BG.

Baclofen (beta-p-chlorophenyl-gamma-aminobutyric acid) transport across rat jejunum.

Biochim Biophys Acta 1993; **1147**(2): 267-72.

Polache A, Pla-Delfina JM y Merino M.

Partially competitive inhibition of intestinal baclofen absorption by beta-alanine, a nonessential dietary aminoacid.

Biopharm Drug Dispos 1991; **12**(9): 647-60.

Reitz RC .

Dietary fatty acids and alcohol: effects on cellular membranes.

Alcohol Alcohol 1993; **28**(1): 59-71.

Robinson GM, Orrego H, Israel Y, Devenyi P y Kapur BM.

Low-molecular-weight polyethylene glycol as a probe of gastrointestinal permeability after alcohol ingestion.

Dig Dis Sci 1981; **26**(11): 971-7.

Rubio G, Jimenez-Arriero MA, Ponce G y Palomo T.

Naltrexone versus acamprosate: one year follow-up of alcohol dependence treatment.

Alcohol Alcohol 2001; **36**(5): 419-25.

Said HM, Sharifian A, Bagherzadeh A y Mock D.

Chronic ethanol feeding and acute ethanol exposure in vitro: effect on intestinal transport of biotin.

Am J Clin Nutr 1990; **52**(6): 1083-6.

Saivin S, Hulot T, Chabac S, Potgieter A, Durbin P y Houin G.

Clinical pharmacokinetics of acamprosate.

Clin Pharmacokinet 1998; **35**(5): 331-45.

Sancho-Tello M, Sanchis R y Guerri C.

Effect of short and long-term ethanol feeding on the extent of metabolic tolerance in female rats.

Alcohol Alcohol 1988; **23**(6): 483-90.

Schipper NG, Varum KM y Artursson P.

Chitosans as absorption enhancers for poorly absorbable drugs. 1:

Influence of molecular weight and degree of acetylation on drug transport across human intestinal epithelial (Caco-2) cells.

Pharm Res 1996; **13**(11): 1686-92.

Schultz SG, Curran PF, Chez RA y Fuisz RE.

Alanine and sodium fluxes across mucosal border of rabbit ileum.

J Gen Physiol 1967; **50**(5): 1241-60.

Scott G .

The metabolism and pharmacokinetics of ¹⁴C AOTA-Ca in man.

Lipha France 1991; **IRI 7488**(data on file).

Seitz HK .

Alcohol effects on drug-nutrient interactions.

Drug Nutr Interact 1985; **4**(1-2): 143-63.

Seitz, H. K. & Suter, P. M.

(1994) Ethanol toxicity and nutritional status. En: *Nutritional toxicology* (eds F. N. Kotsonis, M. Mackey & J. J. Hjelle), pp. 95-116. Raven Press, New York.

Sellman R, Pekkarinen A, Kangas L y Raijola E.

Reduced concentrations of plasma diazepam in chronic alcoholic patients following an oral administration of diazepam.
Acta Pharmacol Toxicol (Copenh) 1975; **36**(1): 25-32.

Sinko PJ y Amidon GL.

Characterization of the oral absorption of beta-lactam antibiotics. II. Competitive absorption and peptide carrier specificity.
J Pharm Sci 1989; **78**(9): 723-7.

Sinko PJ, Hu M y Amidon GL.

Carrier mediated transport of amino acids, small peptides, and their drug analogs.
J Control Release 1987; **6**(1): 115-21.

Spanagel R y Zieglgansberger W.

Anti-craving compounds for ethanol: new pharmacological tools to study addictive processes.
Trends Pharmacol Sci 1997; **18**(2): 54-9.

Sun J, He ZG, Cheng G, Wang SJ, Hao XH y Zou MJ.

Multidrug resistance P-glycoprotein: crucial significance in drug disposition and interaction.
Med Sci Monit 2004; **10**(1): RA5-14.

Torres-Molina F, Aristorena JC, Garcia-Carbonell C, Granero L, Chesa-Jimenez J, Pla-Delfina J y Peris-Ribera JE.

Influence of permanent cannulation of the jugular vein on pharmacokinetics of amoxycillin and antipyrine in the rat.
Pharm Res 1992; **9**(12): 1587-91.

Whitworth AB, Fischer F, Lesch OM, Nimmerrichter A, Oberbauer H, Platz T, Potgieter A, Walter H y Fleischhacker WW.

Comparison of acamprosate and placebo in long-term treatment of alcohol dependence.

Lancet 1996; **347**(9013): 1438-42.

Wilde MI y Wagstaff AJ.

Acamprosate. A review of its pharmacology and clinical potential in the management of alcohol dependence after detoxification.

Drugs 1997; **53**(6): 1038-53.

Wilson FA y Hoyumpa AM, Jr.

Ethanol and small intestinal transport.

Gastroenterology 1979; **76**(2): 388-403.

Zeise ML, Kasparov S, Capogna M y Zieglgansberger W.

Acamprosate (calciumacetylhomotaurinate) decreases postsynaptic potentials in the rat neocortex: possible involvement of excitatory amino acid receptors.

Eur J Pharmacol 1993; **231**(1): 47-52.

Zeise ML, Kasparow S, Capogna M y Zieglgansberger W.

Calciumdiacetylhomotaurinate (CA-AOTA) decreases the action of excitatory amino acids in the rat neocortex in vitro.

Prog Clin Biol Res 1990; **351**: 237-42.

Zornoza T, Cano MJ, Polache A y Granero L.

Pharmacology of acamprosate: an overview.

CNS Drug Rev 2003; **9**(4): 359-74.

Zornoza T, Cano-Cebrian MJ, Nalda-Molina R, Guerri C, Granero L y Polache A.

Assessment and modulation of acamprosate intestinal absorption: comparative studies using in situ, in vitro (CACO-2 cell monolayers) and in vivo models.

Eur J Pharm Sci 2004; **22**(5): 347-56.

Zornoza T, Guerri C, Polache A y Granero L.

Disposition of acamprosate in the rat: influence of probenecid.

Biopharm Drug Dispos 2002; **23**(7): 283-91.

Zornoza-Sabina, T.

Estudios farmacocinéticos y biofarmacéuticos del acamprosato en la rata.

Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad de Valencia. 2003